Aus dem physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

„Enzymstudien in Amoeba chaos chaos L. mit Mikromethoden"

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Borner
aus Berlin

1962

Aus dem physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

"Enzymstudien in Amoeba chaos chaos L. mit Mikromethoden"

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Borner
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald HARNDT

Referent: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst SCHÜTTE

Korreferent: Priv. Doz. Dr. med. Hans-Joachim DULCE

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. Juli 1962

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	Theoretischer Teil	
1.	Verwendete Abkürzungen	4
2.	Einleitung	5
3.	Problemstellung	6
4.	Methoden	8
	Kultur von Amoeba chaos chaos L.	8
	Biochemische Mikromethoden	9
	Geräte zur Mikroanalyse	9
	Der optische Test	11
	In den Mikromaßstab übertragene Methoden	13
	Methoden zur Bestimmung der enzymatischen ATP-Spaltung	13
5.	Übersicht über die Versuchsreihen	14
6.	Besprechung der Versuchsergebnisse	15
a)	Mikroadaptation biochemischer Bestimmungsmethoden	15
b)	Die Enzyme der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus in Kulturamöben	16
c)	Adenosintriphosphat spaltende Enzyme	20
d)	Die Bedeutung der Versuchsergebnisse für weitere Studien mit Kulturamöben	23
B.	Experimenteller Teil	26
	Anhang: Versuche über die Genauigkeit von Mikropipetten	53
C.	Zusammenfassung	57
D.	Literaturverzeichnis	59

A. Theoretischer Teil

1. Verwendete Abkürzungen

ÄDH	Äpfelsäure-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP-ase	Adenosin-5'-triphosphat abbauendes Enzym
DPN^+	Diphosphopyridin-nukleotid, oxydierte Form
DPN.H	Diphosphopyridin-nukleotid, reduzierte Form
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDH	α-Glyzerophosphat-Dehydrogenase
G-6-PDH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
ID	Isozitrat-Dehydrogenase
MDH	Milchsäure-Dehydrogenase
Pa	Orthophosphat
PGK	Phosphoglyzerat-Kinase
PHI	Phosphohexose-Isomerase
PK	Pyruvat-Kinase
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TPN^+	Triphosphopyridin-nukleotid, oxydierte Form
TPN.H	Triphosphopyridin-nukleotid, reduzierte Form
DFA	Diphosphofruktose-Aldolase

2. Einleitung

Für eine Reihe aktueller Fragestellungen in der biochemischen Zytologie erwiesen sich Kulturamöben (die mehrkernige Amoeba chaos chaos L. und die einkernige Amoeba proteus) als sehr geeignete Objekte. Dies gilt insbesondere für das Studium der Pinozytosis (1), der Lokalisation von Enzymen und Stoffwechselvorgängen in der Zelle (6) sowie Untersuchungen über den Einfluß des Zellkerns auf den Zellstoffwechsel (15).

Durch Zentrifugieren einzelner intakter Amöben lassen die Zellorganellen sich in Schichten anreichern und durch Herausschneiden der Schichten unter dem Mikroskop isolieren (18). Die einzellige Amoeba proteus kann darüberhinaus mit der Glasnadel in einen kernhaltigen und einen kernlosen Teil zerlegt werden. Während sich die kernhaltige Hälfte weiterhin wie eine normale Zelle verhält, kann auch der kernlose Teil für 10 - 14 Tage am Leben erhalten werden. Mit dieser Technik ist es gelungen, den Einfluß des Kerns auf die Proteinsynthese (6, 15, 19, 20) den Gehalt an Ribonukleinsäure (26), auf die Atmung (21), auf den Gehalt an Pyridinnukleotiden (22), auf die Permeabilität (23) sowie auf verschiedene Enzymaktivitäten (12, 14, 18) zu studieren.

Obwohl Amöben seit mehr als 20 Jahren für zytologische Studien verwendet werden - neben den genannten biochemischen Studien wurden lichtmikroskopische (1-4, 40-45) und elektronenmikroskopische Untersuchungen (5) durchgeführt - war sehr wenig über den Kohlehydratstoffwechsel dieser Protozoen bekannt. In seinem 1957 erschienenen Buch "Biochemical Cytology" (6) schreibt BRACHET in Bezug auf seine oben angeführten Untersuchungen:

"... Too little is known about the pathway of carbohydrate metabolism in amoeba to draw any definite conclusion from scanty experimental data at our disposal; little is known, in amoeba, concerning the enzymes usually involved in this type of metabolism and the end products of glycolysis have not yet been identified." BRACHET wies in Amöben Enolase (14) nach,

fand aber weder Hexokinase noch Phosphorylaseaktivität. Besonders diese negativen Ergebnisse mit Enzymen, die die Glykolyse nach dem Embden-Meyerhof-Schema einleiten, ließen Zweifel aufkommen, ob die Amöbe Glukose überhaupt in phosphorylierter Form abbaut. Daß Glukose von Amöben metabolisiert wird, ging aus Untersuchungen von CHAPMAN-ANDRESEN und HOLTER (16) hervor. C^{14}-markierte Glukose wurde von Amöben aus dem Kulturmedium aufgenommen und zu $C^{14}O_2$ abgebaut. Außerdem fand BRACHET Glykogen, doch mit einer recht unspezifischen Methode (15). Versuche, den Glukosestoffwechsel mit dem Carthesischen Taucher zu untersuchen, schlugen im Carlsberg-Laboratorium fehl (8). Weder der Zusatz von Glukose noch von Pyruvat oder Azetat beeinflußte die Atmung der Amöben. Über die in Amöben bekannten Enzyme gibt Tabelle 1 Auskunft.

Tabelle 1

In Chaos chaos (C) und Amoeba proteus (P) beschriebene Enzyme.

Enzym	Amöbe		Lit.
Proteolytische Enzyme	CP	LØVTRUP, HOLTER	7
Amylase	C	LINDERSTRØM-LANG, HOLTER	46
Cytochrom b_5	CP	MØLLER, PRESSCOTT	9
Sukzinodehydrogenase	C	ANDRESEN, ENGEL, HOLTER	10
Phosphoamidase	C	MATTENHEIMER, MØLLER	11
Polyphosphatasen	C	MATTENHEIMER	12
Saure Monophosphatase	C	MATTENHEIMER, MØLLER HOLTER, LOWY	13 39
Enolase, ATP-ase	P	BRACHET	14

3. Problemstellung

Für weitere biochemische Studien mit Amöben war es notwendig, Einblick in den Kohlehydratstoffwechsel zu bekommen. Nachdem Versuche

mit dem Carthesischen Taucher zu keinem Ergebnis geführt hatten, erschien der Nachweis der einzelnen Enzyme der Glykolyse, des Trikarbonsäurezyklus und verschiedener phosphatabspaltender und -übertragender Enzyme als der gebotene Weg.

Folgende Ziele wurden für die vorliegende Arbeit gesetzt:

1. Ausarbeitung geeigneter Mikromethoden.
   Die Anwendung von Mikromethoden, die Messung von Enzymaktivitäten unter Verwendung von nur wenigen Amöben pro Versuchsansatz gestatten, war aus folgenden Gründen notwendig:
   a) Amöbenkulturen wachsen nur langsam. Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich die Anzahl der Zellen in 2-3 Tagen.
   b) Für spätere Versuche mit Amöbenhälften sollte mit möglichst wenig Amöben auszukommen sein, da die Technik der Zerteilung der Zellen schwierig ist.

2. Anwendung der ausgearbeiteten Methoden zum Nachweis und Studium der Enzyme der Glykolyse, des Trikarbonsäurezyklus und verschiedener phosphatabspaltender und -übertragender Enzyme in Amoeba chaos chaos L.

3. Überprüfung der Genauigkeit von Mikrokonstriktionspipetten.

   Für die Mikromethoden wurden Konstriktionspipetten nach LEVY (28) benutzt, die wir selbst herstellten. Diese Versuche dienten zur Abschätzung der günstigsten Meß- und Arbeitsgrößen und als Grundlage für die Entwicklung einer Mikropipette aus Polyäthylen.

   Da in unserem Laboratorium gleichzeitig an Mikromethoden für das klinisch-chemische Laboratorium gearbeitet wurde, für das die Verwendung der genannten Pipetten empfohlen wird, behandelten wir den Abschnitt über die Genauigkeit der Mikropipetten besonders ausführlich.

4. Methoden

Kultur von Amoeba chaos chaos L.

Es wurde der Stamm des Carlsberg-Laboratoriums, Kopenhagen, weitergezüchtet nach der Vorschrift von PRESCOTT (24) mit Pringsheimlösung als Nährmedium und gewaschenen Tetrahymena gelii als Futter. Zusammensetzung der Pringsheimlösung: 20 mg $Na_2HPO_4 . 2H_2O$/26 mg KCl/200 mg $Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$/20 mg $MgSO_4 . 7H_2O$/2 mg $FeSO_4 . 7H_2O$, gelöst in 1 l aqua bidest.

Herstellung von Homogenaten und Enzymlösungen.

Zur Herstellung der Homogenate werden Amöben verwendet, die 3 Tage lang nicht mit Tetrahymena gefüttert worden waren. Diese Maßnahme ist notwendig, um eine möglichst vollständige Verdauung der durch Phagozytose aufgenommenen Tetrahymena zu erreichen. Es würde sonst die Gefahr bestehen, daß Enzyme von Tetrahymena mit bestimmt werden. Nach der 3-tägigen Hungerzeit werden die Amöben mit destilliertem Wasser gewaschen, vorsichtig abzentrifugiert und entweder in einem Mikrohomogenisator (Typ POTTER-ELVEJHEM) oder durch 4-5 maliges Einfrieren (Trockeneis) und Auftauen homogenisiert. Nicht am gleichen Tage verwendetes Homogenat wurde in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Gelegentlich wurden auch gewaschene, aber nicht homogenisierte Amöben aufgehogen und erst vor dem Versuch homogenisiert. Von Amöbenkulturen, die z. B. während der Urlaubszeit anfielen, wurden Homogenate gemacht, die anschließend gefriergetrocknet wurden.

In der Mehrzahl der Versuche wurden die zu Homogenat verarbeiteten Amöben gezählt, so daß die Anzahl der Amöben pro Versuchsansatz bekannt war. Es sei aber betont, daß es uns weniger auf eine quantitative Bestimmung der Enzymaktivitäten als auf den Nachweis der Existenz der Enzyme in Amöben ankam.

Für die optischen Teste zur Enzymbestimmung erwiesen sich einige Homogenate als zu trübe und mußten schwach zentrifugiert werden. Während die Mehrzahl der untersuchten Enzyme dabei im Überstand blieben, wurden Isozitrat-Dehydrogenase, "malic enzyme" und Fumarase zum größten Teil mit dem Niederschlag mitgerissen. Eine Methode, um diese Enzyme in Lösung zu bringen, ist unter den entsprechenden Versuchen beschrieben.

Biochemische Mikromethoden

Vorbemerkungen: Die biochemische Mikroanalyse wurde vor ungefähr 30 Jahren im Carlsberg-Laboratorium von K. LINDERSTRØM-LANG und H. HOLTER begründet und seitdem dort und anderenorts ständig weiterentwickelt.

Wir konnten auf den in zahlreichen Publikationen mitgeteilten speziellen und allgemeinen Erfahrungen aufbauen, mußten aber die hier verwendeten Methoden, die größtenteils als Makromethoden bekannt waren, in den Mikromaßstab übertragen.

Von den Geräten zur Mikroanalyse werden nachfolgend einige kurz beschrieben. Auf die ausführlichen Darstellungen von LINDERSTRØM-LANG und HOLTER (25) und MATTENHEIMER (62) sei an dieser Stelle hingewiesen.

Als Photometer wurden die Modelle der Firmen Zeiss und Eppendorf verwendet. Für das ältere Zeiss-Spektralphotometer PM 4 wurde eine Mikroeinrichtung mit einfacher Lochblende analog der Vorschrift LOWRYs (47) für das Beckmann Spektralphotometer von uns gebaut. Der Lichtverlust wird hierbei durch erhöhte Verstärkung, notfalls auch durch erhöhte spektrale Bandbreite kompensiert. Für das Photometer Eppendorf ist ein besonderer Mikroküvettenhalter mit entsprechender Blende im Handel.

In beiden von uns verwendeten Photometern wurden Mikroküvetten von 1,5 - 2 mm Spaltbreite, 10 mm Schichtdicke und 25 mm Höhe verwendet.

Die Mindestvolumina betragen für das Zeiss-Spektralphotometer 100 µl, für das Photometer Eppendorf 200 µl. Zeichnet sich das Gerät von Zeiss durch einen größeren Anwendungsbereich aus, so empfiehlt sich das Photometer Eppendorf andererseits durch seine größere Robustheit und Nullpunktkonstanz.

Als außerordentlich praktisch und schnell im Gebrauch erwies sich die Mikrozentrifuge von Ole Dich, Kopenhagen, eine Winkelzentrifuge mit Zweistufenschaltung und 9000 bzw. 14 000 g Beschleunigung.

Die von uns verwendeten Mikroteströhrchen aus Jenaer Glas hatten die Abmessungen 4,5 x 30 mm und faßten Volumina bis zu 350 µl. Für besondere Anforderungen wurden sie mit Silikonöl präpariert. Als Haltegestelle dienten Holzblöcke mit entsprechenden Bohrungen, bzw. Metalleinsätze für Temperaturbäder. Die Röhrchen passen in die beschriebene Mikrozentrifuge.

Mischvorrichtungen: Als einfache, aber nicht sehr befriedigende Methode dient die Mischung kleiner Flüssigkeitsmengen durch Vibration. Im Mikroteströhrchen mischt man am besten mit elektromagnetischen Rührern ("Flöhen"), eisengefüllten Glaskugeln, die durch einen kleinen Handmagneten bewegt werden. Zum Mischen von Flüssigkeiten in Mikroküvetten mit empfindlicher Wand werden Rührstäbe aus Polyäthylen benutzt, oder man perlt ein indifferentes Gas durch eine Kapillare.

Mikropipetten: Wir verwendeten gläserne Konstriktionspipetten nach LEVY (28), die wir uns selbst herstellten. Wie aus den Ergebnissen der Eichung der Glas-Konstriktionspipetten hervorgeht, nimmt der Fehler der Pipetten mit abnehmendem Volumen erheblich zu. Wir entwickelten daher Mikropipetten aus Polyäthylen, die bei kleineren Volumina genauer sind als gläserne Konstriktionspipetten. Die Eichung von Mikropipetten ist in einem besonderen Abschnitt besprochen (S. 53).

Der einfache und der zusammengesetzte optische Test.

Grundlage des optischen Tests von O. WARBURG (56) ist die hohe spezifische Absorption der reduzierten Formen der wasserstoffübertragenden Koenzyme DPN. H und TPN. H für ultraviolettes Licht, deren Maximum bei 340 mμ liegt. Die oxydierten Koenzyme zeigen im Bereich von 300-400 mμ eine sehr geringe Absorption, die vernachlässigt werden darf. Günstig ist außerdem der Umstand, daß viele biologisch wichtige Substanzen im genannten Wellenlängenbereich nur wenig Licht absorbieren. Diese Umstände ermöglichen die direkte Messung des Verlaufes einer Reaktion gemäß Gl. 1 dadurch, daß man die Konzentration des reduzierten Koenzyms im Reaktionsgemisch jederzeit photometrisch messen kann.

$$\text{Laktat} + \text{DPN}^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Pyruvat} + \text{DPN.H} + \text{H}^+ \quad (\text{Gl. 1})$$

Gleichgewichtskonstante und Konzentration der einzelnen Faktoren bestimmen den Ablauf der Reaktion in Richtung und Geschwindigkeit. In manchen Fällen gelingt das Abfangen eines Reaktionsproduktes, so daß ein quantitativer Umsatz erfolgt. Für analytische Zwecke bietet das System der Gl. 1 folgende Möglichkeiten:

1. Bestimmung einer Enzymaktivität. Bei Substrat- und, wenn möglich, Koenzymsättigung wird das Enzym der limitierende Faktor der Reaktion. Durch Verdünnung der Enzymlösung wird die meßtechnisch günstige Aktivität eingestellt.

   Die Einheit der Enzymaktivität wird definiert als die Änderung der DPN. H (TPN. H)-Extinktion in der Zeiteinheit. Z. B. die Enzymeinheit von BÜCHER ist die Enzymmenge, die bei 25°C, in 1 ml Reaktionsgemisch und bei 10 mm Schichtdicke eine Änderung der Extinktion von 0,001/sec/bewirkt, bei 366 mμ.

   Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt häufig im Laufe der Reaktion ab. In diesem Falle wird die Anfangsgeschwindigkeit als Maß für die Aktivität angesehen und aus der Steigung bzw. dem Abfall der Tangente dieses Kurventeiles ermittelt.

2. Bestimmung einer Substratmenge. In diesem Falle ist das Enzym im Überschuß vorhanden. Das zu bestimmende Substrat ist der den Reaktionsablauf bestimmende Faktor. Die einfachste Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung liegt dann vor, wenn das Gleichgewicht der Gl. 1 so stark auf einer Seite liegt, daß die andere für praktische Zwecke zu vernachlässigen erlaubt ist. Andernfalls kann man einen vollständigen Umsatz durch Abfangen eines Reaktionsproduktes erzielen.

Die Reaktion nach Gl. 1 bietet nur für eine beschränkte Anzahl von Enzymen und Substraten analytische Möglichkeiten. Die Anzahl der Bestimmungsmöglichkeiten läßt sich jedoch vergrößern, indem man Reaktionen vom Typ Gl. 2 und 3 miteinander kombiniert.

$$\text{Fruktose-6-phosphat} \xrightarrow{\text{PHI}} \text{Glukose-6-phosphat} \quad \text{(Gl. 2)}$$

$$\text{Glukose-6-phosphat} + \text{TPN}^{+} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phosphoglukonat} + \text{TPN.H} + \text{H}^{+} \quad \text{(Gl. 3)}$$

Im Gegensatz zum "einfachen optischen Test" wird diese Anordnung als "zusammengesetzter optischer Test" bezeichnet. Sein Anwendungsbereich umfaßt alle enzymatischen Reaktionen, die ein Substrat für eine wasserstoffübertragene Reaktion liefern. Einer Reaktion nach Gl. 2 kann noch eine weitere Reaktion vorgeschaltet werden. Zur Bestimmung von Substraten muß entweder ein entsprechendes Gefälle in der Enzymkette vorliegen, oder das Endprodukt muß aus dem System entfernt werden. Will man Enzymaktivitäten im zusammengesetzten optischen Test bestimmen, muß das Reaktionsgemisch so große Mengen Hilfsenzym (Gl. 3) enthalten, daß eine vollständige Umsetzung auch unterhalb der Enzymsubstratsättigungskonzentration erfolgt.

Die Technik des optischen Tests ist einfach. Als Meßgerät wird ein Photometer benötigt, das die Lichtwellenlängen 340 und/oder 366 mμ liefert. Als Eiweißfällungsmittel für Substratlösungen wurde Perchlorsäure verwendet, die anschließend als Kaliumsalz in der Kälte gefällt und ab-

zentrifugiert werden kann. Nebenreaktionen durch andere Substanzen und Enzyme lassen sich durch Vorinkubation und Leerwerte ausschalten. Sämtliche Untersuchungen wurden im Mikromaßstab ausgeführt; die aus der Literatur ersichtlichen Versuchsbedingungen wurden entsprechend angepaßt. Sie sind für die einzelnen Enzyme im experimentellen Teil B angegeben.

Folgende optische Testmethoden übertrugen wir in den Mikromaßstab (die Literaturzitate bezeichnen die Makromethode): Hexokinase (59), Zwischenferment (49), Phosphohexo-Isomerase (59), Aldolase (48), Glyzerophosphat-Dehydrogenase (48), Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (48), Phosphoglyzerat-Kinase (55), Enolase (48), Pyruvat-Kinase (48), Milchsäure-Dehydrogenase (48), Isozitrat-Dehydrogenase (50), Fumarase (53, 61), Äpfelsäure-Dehydrogenase (54), "malic-enzyme" (51).

Methoden zur Bestimmung der enzymatischen ATP-Spaltung.

Die Bestimmung der ATP-ase-Aktivität erfolgte

a) durch Bestimmung des abgespaltenen Orthophosphats mit der Methode nach LOWRY und LOPEZ (47) in der Mikromodifikation von MATTENHEIMER (12).
b) Durch Bestimmung des nicht abgebauten ATP mit einer Mikromodifikation des optischen Tests.

Der optische Test nach O. WARBURG (56) wurde von KORNBERG (59) zur quantitativen Bestimmung von ATP benutzt, unter Verwendung der Enzyme Hexokinase und Zwischenferment. Die Schwierigkeit der Reindarstellung der Hexokinase verhinderte die Routineanwendung des Tests. HOLLOWAY (58) verwendete in einer halbenzymatischen Anordnung das leichter präparierbare Enzym Phosphoglyzerat-Kinase. Die Eichkurve verläuft jedoch nur in einem engen Bereich geradlinig. Die Koppelung des Enzyms mit Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase im optischen Test (57) ergab eine einfache, empfindliche Bestimmungsmethode von

hoher Spezifität. Durch Anpassung an die Mikrotechnik konnte die untere Nachweisgrenze auf 1 γ ATP/Küvette gesenkt werden. Eine Senkung auf 0,1 γ erscheint bei geringen apparativen Änderungen möglich. Sehr viel empfindlichere Bestimmungsmethoden für ATP (60) erschienen für unsere Zwecke zu aufwendig.

c) Durch papierchromatographische Bestimmung von ATP/ADP/AMP.

Zur Trennung von Adenosinphosphorsäuren wurde von COHN und CARTER (30) zuerst die Säulenaustauscherchromatographie benutzt. In der papierchromatographischen Analyse bedient man sich meist zweistufiger Verfahren, die jedoch den Nachteil größerer Laufzeiten haben (31, 32). Die Methode von KUNZ und SCHMID (33), aufsteigend, mit nur einem Lösungsmittel, ergab bei mehrfacher Wiederholung nur eine ungenügende Trennung von ATP/ADP/AMP.

Bei der papierchromatographischen Trennung von anorganischen Oligophosphaten mit den von THILO und GRUNZE beschriebenen Lösungsmitteln (34) fiel eine gewisse Ähnlichkeit des Verhaltens von ADP und ATP mit dem von Tri- und Tetrameta-phosphat auf. Die Entwicklung dieser Lösungsmittel ging auf systematische Untersuchungen EBELs (35) über die Trennung von Poly- und Metaphosphaten zurück. Wir variierten die Lösungsmittel systematisch und fanden optimale Bedingungen für die eindimensionale Papierchromatographie für Adenosinphosphate.

5. Übersicht über die durchgeführten Versuche.

1) Mikroadaptation spektralphotometrischer und kolorimetrischer Bestimmungsmethoden für Enzymaktivitäten und Substratkonzentrationen. (Vers. 1-2, 20)
2) Die Enzyme der Glykolyse in Amoeba chaos chaos L. Nachweise und Wirkungsbedingungen. (Vers. 3-9, 17-19)
3) Enzyme des Zitronensäure-zyklus in Amoeba chaos chaos L. (Vers. 10-16)

4) Adenosintriphosphat spaltende Enzyme in Amoeba chaos chaos L. (Vers. 21-28)
Entwicklung eines Lösungsmittelgemisches zur eindimensionalen Papierchromatographie von Adenosinphosphaten. (Vers. 27)
5) Versuche über die Genauigkeit von Mikropipetten.

6. Besprechung der Versuchsergebnisse.

a) Mikroadaptation biochemischer Bestimmungsmethoden.

Die Verwendung von Mikrozusatzeinrichtungen zum Zeiss-Spektralphotometer PM 4 und zum Photometer Eppendorf gestatten Messungen in spaltförmigen Mikroküvetten mit Volumina von 100 - 300 µl. Damit war die Möglichkeit gegeben, die angewandten Bestimmungsmethoden, ursprünglich angegeben für Volumina zwischen 2 und 5 ml, durch einfache Verkleinerung der Volumina um das Zehn- bis Fünfzigfache in den Mikromaßstab zu übertragen.

Sofern ein Versuchsansatz direkt in der Mikroküvette durchgeführt wird - z.B. optische Tests - besteht die Schwierigkeit der sorgfältigen Mischung der Reagenzien in der Küvette. Durchblasen von Luft mit einer Glaskapillare ist nicht angezeigt, da durch Schäumen Inaktivierung von Enzymen eintreten kann. Dünne Glasstäbchen als Rührer führen leicht zur Beschädigung der Küvettenwände, so daß wir Rührstäbchen aus Polyäthylen zur Verwendung in Mikroküvetten einführten.

Zum Pipettieren kleiner Volumina haben sich Konstriktionspipetten aus Glas (28) am besten bewährt. Bei der Eichung von uns selbst angefertigter Pipetten beobachteten wir, daß die Streuung der Pipetten mit kleiner werdendem Volumen zunimmt, und führten deshalb eine eingehende Studie über die Genauigkeit der Pipetten durch, die in einem besonderen Abschnitt (S. 53) behandelt wird. Im Verlauf dieser Untersuchungen entwickelten wir einen neuen Mikropipettentyp aus Polyäthylenkapillaren (29), der sich im Bereich von 0,4 - 10 µl als genauer und wesentlich

einfacher herzustellen erwies als gläserne Konstriktionspipetten gleicher Größe. Kürzlich wurde von MATTENHEIMER (62) ein Verfahren zur Herstellung von Konstriktionspipetten aus Polyäthylen mitgeteilt.

Zum Rühren von kleinen Volumina in Mikroteströhrchen verwenden wir kleine magnetische Rührer, in Glas eingeschmolzenen Eisenstaub ("Flöhe"), die mit einem starken Handmagneten bedient werden. Mit Hilfe der "Flöhe" gelingt die homogene Mischung kleinster Tropfen. Die Genauigkeit der Mikromethoden geht aus zwei Beispielen hervor, in denen die Mikromodifikation parallel zur Makromethode ausgeführt wurde: 1) Am Beispiel der Phosphatbestimmung (Versuch 1) wurde demonstriert, daß eine 50-fache Verkleinerung des Meßvolumens die Genauigkeit der Bestimmung nicht herabsetzt. Die mittleren Fehler der Einzelmessung (fm) wurden für die Makromethode mit $\pm$ 3,4%, für die Mikromodifikation mit $\pm$ 2,9% bestimmt. 2) Am Beispiel eines optischen Tests (Äpfelsäuredehydrogenase, Versuch 2) wurde gefunden, daß die Verkleinerung des Meßvolumens auf 1/30 im Parallelversuch zur Makromethode, im Rahmen des Ablesefehlers identische Resultate ergab.

b) Die Enzyme der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus in Kulturamöben.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, hat BRACHET (6, 15) weder Hexokinase noch Phosphorylase in Amöben nachweisen können. Andererseits war aber von HOLTER und CHAPMAN-ANDRESEN (16) über den Abbau von C^{14}-Glukose zu $C^{14}O_2$ berichtet worden. Diese Tatsache ist aber kein Beweis dafür, daß Glukose über die Glykose und den Zitronensäurezyklus metabolisiert wird. In einigen Schimmelpilzen und Bakterien ist eine Glukose-Oxydase nachgewiesen worden, die Glukose ohne Phosphorylierung zu Glukonsäure oxydiert. DATTA et al. (63) fanden in Versuchen mit Acetobacter melanogenum ein Enzymsystem, das nichtphosphorylierte Glukose über Glukonsäure zu 2,5 - Diketoglukonsäure oxydiert und diese zu einer bisher nicht identifizierten C_5-Ver-

bindung dekarboxyliert, und diese schließlich in α-Ketoglutarsäure umwandelt. Ein anderer Abbaumechanismus für Hexosen ohne einleitende Phosphorylierung wurde von DE LEY et al. (64) in Pseudomonas saccharophila aufgefunden:

D-Galaktose $\xrightarrow[-2H]{DPN}$ D-Galakto-γ-lakton $\xrightarrow{+H_2O}$ D-Galaktonsäure. $\xrightarrow{-H_2O}$ 2-Keto-3-desoxy-D-galaktonsäure $\xrightarrow{+ ATP}$ Brenztraubensäure + D-Glyzerinaldehyd-3-phosphat.

Wir begannen unsere Versuche mit dem Hexokinasetest und fanden im Gegensatz zu BRACHET (6) ein positives Ergebnis (Versuch 3). Hiermit war die einleitende Reaktion der Glykolyse in Amoeba chaos chaos L. nachgewiesen, und wir studierten im folgenden alle diejenigen Enzymreaktionen der Glykolysekette, die sich mit dem einfachen oder zusammengesetzten optischen Test nachweisen lassen.

Folgende Enzyme wurden gefunden: Hexokinase (Versuch 3 - 4), Phosphohexo-Isomerase (Versuch 5), Aldolase (Versuch 6), Triosephosphat-Dehydrogenase und Phosphoglyzerat-Kinase (Versuch 7), Enolase (Versuch 8) und Pyruvat-Kinase (Versuch 9). Damit waren 7 Enzyme der Glykolyse (Abb. 1) nachgewiesen, und wir haben bewiesen, daß die Amöbe Glukose über die bekannte Glykolysekette zu Brenztraubensäure abbauen kann. Enzyme, die Brenztraubensäure zu Milchsäure reduzieren oder zu Azetaldehyd dekarboxylieren, wurden von uns nicht gefunden. Amoeba chaos chaos L. enthält außerdem Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Versuch 17-19). Ob dieses Enzym einen Hexosemonophosphatshunt in Amöben einleitet, haben wir noch nicht untersucht.

Von den Enzymen des Zitronensäurezyklus untersuchten wir und wiesen nach: Isozitrat-Dehydrogenase (Versuch 10-11), Fumarase (Versuch 12), Äpfelsäure-Dehydrogenase (Versuch 13-16) und "malic enzyme" (Versuch 12).

Wenngleich wir auf drei Enzyme ("condensing enzyme", Oxalsukzinat-Dekarboxylase und dekarboxylierende α-keto-glutarat-Oxydase) noch nicht untersuchten, ergibt sich doch mit der von HOLTER et al. (10) nachgewiesenen Sukzinat-dehydrogenase ein Bild (Abb. 1), das mit Sicherheit auf das Vorhandensein des Zitronensäurezyklus in Amoeba chaos chaos L. schließen läßt.

In bisher unveröffentlichten Versuchen wurden von SCHMITZ und MATTENHEIMER (65) Glutamat-pyruvat-Transaminase und Glutamat-oxalazetat-Transaminase nachgewiesen.

Ein quantitativer Vergleich der Aktivitäten der verschiedenen nachgewiesenen Enzyme aus unseren Versuchen ist nicht möglich. Erst nach Abschluß dieser Versuche wurde eine Mikroproteinbestimmungsmethode entwickelt (66), die es gestattet, Protein in wenigen µl Amöbenhomogenat zu bestimmen. Wir haben bei den Versuchsansätzen zwar angegeben, wievielen Amöben die eingesetzte Homogenatmenge äquivalent ist, doch mußten die Homogenate für die optischen Tests zentrifugiert werden. Hierdurch wurden einige Enzyme infolge unterschiedlicher Löslichkeit im Überstand nicht quantitativ erfaßt. Wie in Abschnitt A 4 ausgeführt, benutzten wir das Zeiss-Spektralphotometer PM 4 mit einer selbst angefertigten Mikrozusatzeinrichtung. Die Verwendung von spaltförmigen Mikroküvetten macht es notwendig, eine punktförmige Blende zur Verkleinerung des Strahlenquerschnitts vor die Küvetten zu schalten. Hierdurch entsteht ein Verlust von etwa 90% der einfallenden Lichtintensität, und bei stärker getrübten Homogenaten ließ sich das Gerät nicht auf den Nullpunkt kompensieren. Das neue Zeiss-Spektralphotometer mit dem Monochromator PMQ II ist für die Mikroadaption mit einem Linsensystem ausgestattet, das das aus dem Monochromator austretende Strahlenbündel kondensiert und die Lichtverluste auf ein Mindestmaß herabsetzt. Mit dieser Einrichtung, die uns nicht zur Verfügung stand, ist es möglich, die Enzymaktivitätsbestimmung in getrübten Homogenaten durchzuführen (persönliche Mitteilung H. MATTENHEIMER).

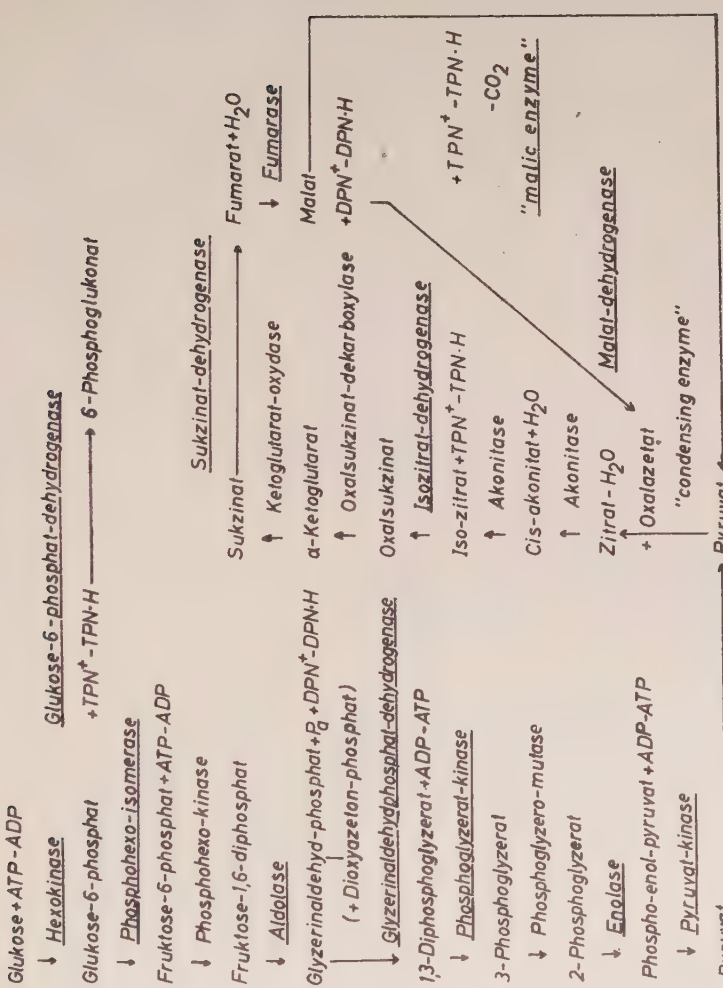

Abb. 1: Übersicht über die Enzyme der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus in Amoeba chaos chaos L. Die nachgewiesenen Enzyme sind unterstrichen. Die benötigten Koenzyme und Phosphat-donatoren sind mit aufgeführt.

Für einige der Enzyme bestimmten wir das pH-Optimum und die Michaeliskonstante (K_M). Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Konstanten untersuchter Enzyme.

Enzym	pH-Optimum	K_M	Versuch
Hexokinase	7,2	-	4
Isozitrat-Dehydrogenase	8,3	-	11
Äpfelsäure-Dehydrogenase	8,1	10^{-4}m	14, 15
Glukose-6-ph-Dehydrogenase	7,9	$1,1.10^{-4}$ (Glukose-6-ph)	18, 19

c) Adenosintriphosphat spaltende Enzyme in Amoeba chaos chaos L.

In Amoeba chaos chaos L. waren 2 saure Phosphomonoesterasen (13), eine Phosphoamidase (11) und verschiedene anorganische Poly- und Metaphosphatasen (12) gefunden worden. Wir untersuchten ATP abbauende Enzyme.

Drei Enzyme, die Phosphat von ATP abspalten, sind bekannt:

(a) ATP-monophosphatase, ATP —— ADP + Orthophosphat

(b) ATP-diphospatase, ATP —— AMP + 2 Orthophosphat

(c) ATP-pyrophosphatase, ATP —— AMP + Pyrophosphat

Zum Nachweis der Enzymaktivität werden entweder ATP oder die Abbauprodukte stimmt. Nachdem wir in Vorversuchen festgestellt hatten, daß ATP von Amöben abgebaut wird, kombinierten wir zwei Nachweismethoden, um entscheiden zu können, welches oder welche der drei Enzyme vorkommen:

1) Bestimmung von ATP. Die enzymatische ATP-Bestimmung im optischen Test (57) wurde in den Mikromaßstab übertragen. Eine mit

ATP-Lösung aufgestellte Eichkurve verläuft linear mit nur geringfügiger Streuung der Werte (Versuch 20).

2) Papierchromatographie. Für die papierchromatographische Trennung von ATP/ADP/AMP und Orthophosphat arbeiteten wir ein Lösungsmittelgemisch aus, das bei eindimensionaler Papierchromatographie eine gute Trennung ergab (Versuch 27). In Analogie zu den zitierten Versuchen EBELs (35) wurde ein Gemisch aus Trichloressigsäure, Wasser und Isopropanol systematisch variiert (Versuch 27a). Aus dieser ersten Serie wurde das Lösungsmittel, welches die Substanzen ATP/ADP/AMP und Orthophosphat am besten trennte, durch Zusatz von Ammoniak abgewandelt, um eine bessere Trennung von ATP und ADP zu erreichen (Versuch 27b). Ein Einfluß der Temperatur auf die Trennschärfe konnte nicht festgestellt werden. Die Trennschärfe war bei Zimmertemperatur nicht herabgesetzt im Vergleich zu Ansätzen bei 10°C.

Es wurden noch die R_f-Werte einiger Zuckerphosphate bestimmt. Die teilweisen Überlagerungen mit Adenosinphosphorsäuren störten jedoch bei späteren Untersuchungen nicht (Tab. 3).

Tabelle 3

R_f-Werte organischer Phosphorsäureverbindungen.

Lösungsmittel: 4 g Trichloressigsäure/ 35 ml Wasser/ 65 ml Isopropanol/ 0,2 ml NH_3 (25%)

Substanz	R_f
ATP	0,19
ADP	0,30
AMP	0,55
Orthophosphat	0,66 - 0,73
Glukose-6-phosphat	0,45
TPN^+	0,06
Ribose-5-phosphat	0,56
Glukose-1-phosphat	0,46
2-Phosphoglyzerat	0,59
Triosephosphate	0,21; 0,51
Fruktose-1,6-diphosphat	0,47

Bei der photoelektrischen Auswertung der Chromatogramme findet sich regelmäßig im aufsteigenden Teil der ATP-Zacke eine kleine zusätzliche Zacke (Abb. 31, O'-Kurve). Es könnte sich hierbei um Adenosin-tetraphosphat handeln, das sich nach SACKS (38) in Handelspräparaten von ATP häufig findet.

Wir mußten die Möglichkeit, zwischen Reaktion b und c unterscheiden zu können, von vornherein ausschließen,da in Amöben eine Pyrophosphatase vorkommt (12), die durch eine ATP-Pyrophosphatase nach Reaktion c abgespaltenes Pyrophosphat sofort weiter zu Orthophosphat abbaut.

Bei gleichzeitiger Bestimmung von ATP und seinen Abbauprodukten im Enzymversuch (Versuch 28) fanden wir nach 20 min einen Abbau von 55% des ATP und ein molares Verhältnis $ATP_{abgebaut}/Orthophosphat_{gebildet} = 1 : 1,29$ unter Berücksichtigung der im optischen Test gewonnenen Werte der ATP-Bestimmung. Dieses Verhältnis zeigt an, daß weder Reaktion a (1:1) noch Reaktion b (1:2) allein wirksam ist. Von den Versuchsansätzen wurden außerdem entsprechende Mengen zur Zeit 0' und 20' der papierchromatographischen Analyse unterworfen. Die relativen Nukleosidkonzentrationen wurden planimetrisch ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Hierbei wurde das gebildete Orthophosphat aus der Menge des neugebildeten ADP und AMP errechnet. Für das Molenverhältnis $ATP_{abgebaut}/Pa_{gebildet}$ ergibt sich aus Tab. 4 1 : 1,48 und stimmt gut mit dem Wert von 1 : 1,29 überein.

Tabelle 4

Quantitative Auswertung eines Papierchromatogrammes eines enzymatischen ATP-Abbauversuchs.

Die Zahlen stellen relative Molverhältnisse dar. ATP ist zur Zeit 0' = 1,0 gesetzt.

Adenosin-phosphat	Inkubationszeit 0'	20'	Zunahme bzw. Abnahme nach 20'	Pa gebildet (berechnet)
ATP	1,0	0,52	- 0,48	-
ADP	0,41	0,66	+ 0,25	0,25
AMP	0,12	0,35	+ 0,23	0,46

Da pro Mol ADP 1 Mol Pa und pro Mol AMP 2 Mol Pa gebildet werden, ist die Menge an gebildeten Pa = (1x0,25) + (2x0,23) = 0,71 und das Molverhältnis $ATP_{abgebaut}/Pa_{gebildet}$ = 1 : 1,48.

Es sind demnach mindestens zwei Enzyme wirksam:

1) Eine ATP-Monophosphatase (a)

2) Eine ATP-Diphosphatase (b), wobei aus den oben genannten Gründen eine ATP-Pyrophosphatase (c) nicht ausgeschlossen werden kann.

Wir ermittelten das pH-Optimum der enzymatischen ATP-Spaltung einmal durch Bestimmung des abgespaltenen Phosphats (Versuch 23) und durch die Bestimmung von ATP und fanden ein scharfes Maximum bei pH 4,4 bzw. 4,5. Die maximale Fermentaktivität liegt damit im gleichen Bereich wie die der Phosphomonoesterasen (13, 39) Phosphoamidase (11) und anorganischen Poly- und Metaphosphatasen (12).

Die Michaeliskonstante ist $K_M = 1,9 \times 10^{-3}$ m ATP (Versuch 24).

Dialyse des Amöbenhomogenats gegen destilliertes Wasser führt zu keiner Änderung der Enzymaktivität. Magnesiumionen aktivieren in Konzentrationen über 10^{-2} m (Versuch 25). Wird Amöbenhomogenat bei Zimmertemperatur aufgehoben, so steigt die Aktivität in den ersten 24 Stunden etwas an, um dann im Verlauf der nächsten Tage stetig abzunehmen (Versuch 26). Ein gleiches Verhalten wurde für die Phosphomonoesterasen in Amöben gefunden (13). Das Enzym geht bei der Bereitung der Homogenate in Lösung, Zentrifugieren der Homogenate führt zu keinerlei Aktivitätsverlust im Überstand; die Niederschläge sind inaktiv.

d) Bedeutung der Versuchsergebnisse für weitere Studien mit Kulturamöben.

Mit dem Nachweis der Enzyme der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus und der Ausarbeitung der entsprechenden Mikromethoden ist eine empfindliche Lücke in der Kenntnis des Stoffwechsels von Kulturamöben geschlossen. Studien, wie sie vor allem von BRACHET (6) mit kernhaltigen und kernlosen Amöbenhälften durchgeführt wurden, können nun we-

sentlich erweitert werden und erlauben Rückschlüsse auf den Einfluß des Zellkerns, auf den Glukosestoffwechsel und auf einzelne Enzyme der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus.

Man ist versucht, die zu den Protozoen gehörenden Amöben als eine Art "Modell" für tierische Zellen anzugehen und z. B. die Befunde der Arbeiten von BRACHET (6) zu generalisieren. Es darf aber nicht übersehen werden, daß jede Protozoenzelle einen vollständigen Organismus darstellt, der alle Lebensfunktionen ausführt, ohne die in höheren Tieren ökonomische Verteilung spezieller Stoffwechselfunktionen auf bestimmte Zellen (Organe). Dennoch haben so spezialisierte Zellen wie Leberzellen, Nervenzellen und Muskelzellen gemeinsame biologische Eigenschaften, z. B. den Glukosestoffwechsel. In diesem Zusammenhang war es interessant, zu finden, daß Amöben die Enzyme der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus enthalten. Weitere Versuche sind notwendig, um abzuklären, inwieweit die Amöbe, wenigstens bezüglich der von uns untersuchten Enzymsysteme, als Modell für tierische Zellen schlechthin anzusehen ist.

Es ist nicht bekannt, ob Glukose die Hauptenergiequelle für Kulturamöben darstellt. Amöben phagozytieren andere tierische und pflanzliche Mikroorganismen wie Ziliaten und Bakterien. Darüber hinaus benötigen sie bestimmte anorganische Salze (s. Seite 8) im Kulturmedium. Über Versuche, Amöben in salzhaltiger Glukoselösung ohne Zusatz von anderen Mikroorganismen zu kultivieren, ist uns nichts bekannt.

Amöben können in Salzlösung ohne Fütterung (Tetrahymena) für 3 - 4 Wochen überleben, müssen also über einen Energiespeicher verfügen. Das Zellvolumen nimmt um 70-80% ab, und Nahrungsvakuolen verschwinden bereits nach 2-3 Tagen vollständig. Von den im Mikroskop sichtbaren Zelleinschlüssen nehmen sonst nur die Fetttröpfchen während längerer Hungerperioden ab, und es wird die Möglichkeit diskutiert, daß Fett als Energiespeicher dient. BRACHET (6) wies Glykogen in Amöben nach; doch ist seine Methode nicht sehr spezifisch. Schließlich wurden anorga-

nische Polyphosphate in Amöben gefunden (12), die als Energiespeicher dienen können. Ob allerdings Polyphosphate während einer Hungerperiode abnehmen, ist noch nicht untersucht. Während die Stufen des Abbaues von Polyphosphaten und die entsprechenden Enzyme bekannt sind (12), wissen wir über die Biosynthese nur, daß ATP erforderlich ist (69). Da ATP während der Glykolyse und des weiteren Abbaues von Pyruvat gebildet wird, besteht durchaus die Möglichkeit, daß Polyphosphate als Energiespeicher dienen.

Der Nachweis einer ATP-ase in Amöben wirft den Gedanken auf, die ATP-Spaltung mit der Amöbenbewegung in Zusammenhang zu bringen. Wir fanden in orientierenden Versuchen auch eine Adenylat-Kinase. Es bestehen also Parallelen zu enzymatischen Vorgängen bei der Muskelkontraktion. Einzelheiten sind aber noch nicht untersucht. Interessant dürfte es in diesem Zusammenhang auch sein, die Beziehungen dieser beiden Enzyme zur Pinozytose (1) (aktive Invagination der Zellmembran mit Abschnürung und Vakuolenbildung zur Aufnahme von Flüssigkeit und gelösten Stoffen) aufzuklären, zumal Pinozytose nicht nur bei Amöben, sondern auch in Leukozyten (67) und Gewebekulturzellen (68) beobachtet wird.

Mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen wurde die Grundlage geschaffen, um die diskutierten Probleme experimentell angehen zu können.

B. Experimenteller Teil

Versuch 1

Bestimmung von Orthophosphat nach LOWRY und LOPEZ (47), in der Mikromodifikation von MATTENHEIMER (12).

Die auf Phosphat zu analysierende Lösung wird mit Trichloressigsäure (TCE) in einer Endkonzentration von 5% enteiweißt und zentrifugiert. Ein aliquoter Teil des Überstandes wird auf pH 4,0 - 4,1 gepuffert und die Phosphatbestimmung mit Molybdatreagenz und Askorbinsäure bei 870 mμ durchgeführt.

a) Eichkurve, aufgenommen mit der Makro- und Mikromethode.
Standardlösung 50-40-30-20-10 γ P/ml

Makroansatz		Mikroansatz
1,0 ml	P-Lösung	20 μl
2,0 ml	TCE	40 μl
davon		davon
1,0 ml	Überstand	20 μl
7,0 ml	Puffergemisch +	140 μl
1,0 ml	1% Ammoniummolybdat	20 μl
1,0 ml	1% Askorbinsäure	20 μl
10,0 ml		200 μl

+Puffergemisch: 11 Teile Na-Azetatpuffer 0,2 m pH 4,0
+ 0,2 m Na-Azetat.

Die Eichkurve ist in Abb. 2 dargestellt (umseitig).

b) Bestimmung des mittleren Fehlers der Einzelmessung (fm)+ für den Makro- und Mikroansatz.
P-Lösung: 20 γ P/ml

$$^{+}fm = \sqrt{\frac{(f^2)}{n - 1}}$$

Makroansatz	$E^{10\ mm}_{870\ m\mu}$	Mikroansatz
0,312		0,310
0,306		0,305
0,306		0,308
0,308		0,306
0,310		0,308
0,305		0,306
0,306		0,315
0,308		0,310
0,306		0,306
0,306		0,308
0,307 ± 3,4%	Mittelwert fm	0,308 ± 2,9%

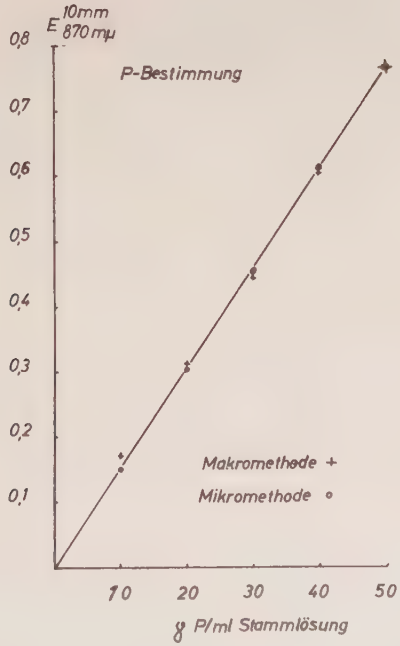

Abb. 2. Phosphatbestimmung, Vergleich von Makro- und Mikromethode.

Versuch 2

Bestimmung der Äpfelsäure-Dehydrogenase in Rattenleberextrakt. Optischer Test im Makro- und Mikromaßstab. 6 mg Rattenleber (Frischgewicht) homogenisiert in 100 µl Trispuffer 0,1 m, pH 7,2 zentrifugiert. Verwendung des Überstandes. 1 µl = 60 γ Leber. Inkubation direkt in 10 mm-Küvetten, 3 ml-Küvette für Makroansatz, 300 µl-Küvette für Mikroansatz. Versuchstemperatur 25°C.

Makroansatz		Mikroansatz
2,55 ml	Trispuffer pH 7,2 0,1 m	85 µl
0,15 ml	DPN.H 6×10^{-3} m	5 µl
0,15 ml	Enzymlösung	5 µl
0,15 ml	Oxalazetat 7×10^{-3} m	5 µl
3,0 ml		100 µl

Relative Enzymkonzentration (Verdünnung der Enzymlösung mit Puffer)	$\Delta E^{10\ mm}_{366\ m\mu}$/min	
	Makroansatz	Mikroansatz
1,00	0,048	0,049
0,75	0,036	0,037
0,50	0,025	0,024
0,25	0,013	0,012

Versuch 3

Nachweis von Hexokinase (HK).

Reaktion: Glukose + ATP $\xrightarrow{HK}$ Glukose-6-phosphat + ADP

Glukose-6-phosphat + $TPN^+ \xrightarrow[(zugesetzt)]{G\text{-}6\text{-}PDH}$ 6-Phosphoglukonat + TPN.H + H^+

Versuchsansatz:

250 µl Veronal-Puffer 0,1 m pH 7,2
10 µl TPN^+ 10^{-3} m
10 µl ATP 7×10^{-2} m
5 µl Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Boehringer)
5 µl $MgCl_2$ 0,6 m
20 µl Amöbenhomogenat, von ca. 20 Amöben
25 µl Glukose $1,75 \times 10^{-2}$ m

Den Reaktionsablauf zeigt Abb. 3.

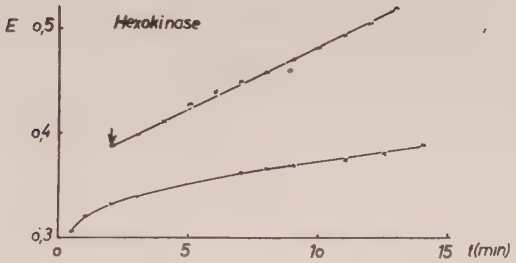

Abb. 3. Nachweis von Hexokinase.
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mμ
Untere Kurve- Leerversuch ohne Glukose bzw. ATP
Obere Kurve - Enzymversuch mit Glukose bzw. ATP

Versuch 4

pH-Optimum der Hexokinase.

Technik wie im vorangegangenen Versuch unter Verwendung eines Veronal-HCl-Puffers pH 6,6 - 8,3.

Das Ergebnis zeigt Abb. 4 (nächste Seite).

Versuch 5

Nachweis von Phosphohexo-Isomerase (PHI)

Reaktion: Fruktose-6-phosphat $\xrightarrow{PHI}$ Glukose-6-phosphat

Glukose-6-phosphat + TPN^+ $\xrightarrow[\text{(zugesetzt)}]{\text{G-6-PDH}}$ 6-Phosphoglukonat + $TPN.H^+ + H^+$

Versuchsansatz:

265 μl Trispuffer 0,1 m pH 7,2 + $MgCl_2$ 0,01 m
10 μl TPN^+ 10^{-3}m
4 μl Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Boehringer)
10 μl Fruktose-6-phosphat 1,5 x 10^{-2}m
20 μl Trockenpulverhomogenat von ca. 10-20 Amöben

Nach Enzymzugabe wird zentrifugiert: 1' x 9000 g, und der Reaktionsablauf im klaren Überstand verfolgt (Abb. 5), (nächste Seite).

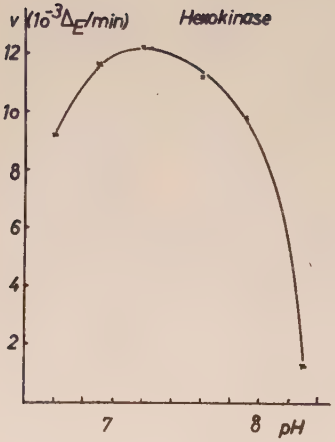

Abb. 4. pH-Aktivitätskurve der Hexokinase.
Abszisse: pH des Reaktionsgemisches.
Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit.

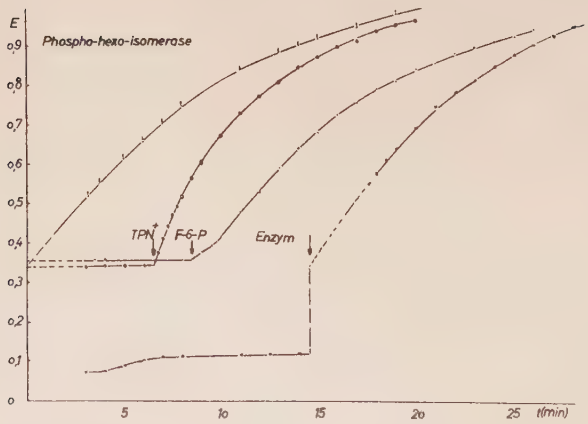

Abb. 5. Nachweis von Phosphohexo-Isomerase
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mμ
TPN-Zusatz von TPN nach Vorinkubation ohne TPN
F-6-P-Zusatz von Fruktose-6-phosphat nach Vorinkubation. Enzym-Zusatz von Amöbenenzym nach Vorinkubation.

Versuch 6

Nachweis von Aldolase. (DFA)

Reaktion: Fruktose-1,6-diphosphat $\xrightarrow{DFA}$ Glyzerinaldehyd-phosphat + Dioxyazeton-phosphat

Glyzerinaldehyd-phosphat $\xrightarrow{TIM}$ Dioxyazeton-phosphat

Dioxyazeton-phosphat + DPN.H + H^+ $\xrightarrow[(zugesetzt)]{GDH}$ α-Glyzero-phosphat + DPN^+

Versuchsansatz:

265 µl Collidin-Puffer 0,05 m pH 7,4 + Fruktose-1,6-Diphosphat 2×10^{-3}m + Monojodazetat 3×10^{-4}m

5 µl DPN.H $1,2 \times 10^{-2}$m

4 µl Triosephosphat-Isomerase/ α-Glyzerophosphat-Dehydrogenase (Boehringer)

20 µl Amöbenhomogenat, 1' x 9000 g zentrifugiert, ca. 10 Am.

Den Verlauf der Reaktion zeigt Abb. 6

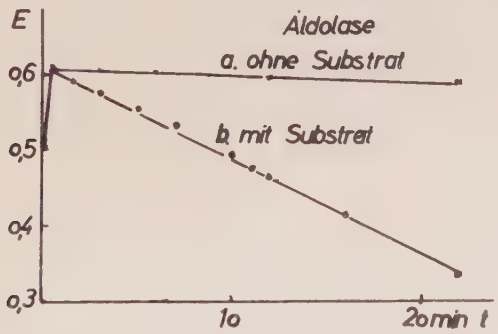

Abb. 6. Nachweis von Aldolase
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mµ
a. Leerwert ohne Fruktose-1,6-diphosphat
b. Enzymansatz.

Versuch 7

Nachweis von Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Phosphoglyzerat-Kinase (PGK).

Reaktion: 3-Phosphoglyzerat + ATP $\xrightarrow{PGK}$

1,3-Diphosphoglyzerat + ADP

1,3-Diphosphoglyzerat + DPN.H + H^+ $\xrightarrow{GAPDH}$

Glyzerinaldehyd-phosphat + DPN^+ + H_3PO_4

Versuchsansatz:

240 µl Triäthanolamin-Puffer 0,1 m pH 7,6 + $MgSO_4$ 4 x 10^{-3} m
+ Zystein 3 x 10^{-3} m + 3-Phosphoglyzerat 6 x 10^{-3} m

10 µl DPN.H 1,2 x 10^{-2}, m

20 µl ATP 2 x 10^{-3} m

20 µl Amöbenfrischhomogenat, zentrifugiert 1' x 9000 g,
etwa 10 Amöben entsprechend.

Den Reaktionsablauf zeigt Abb. 7.

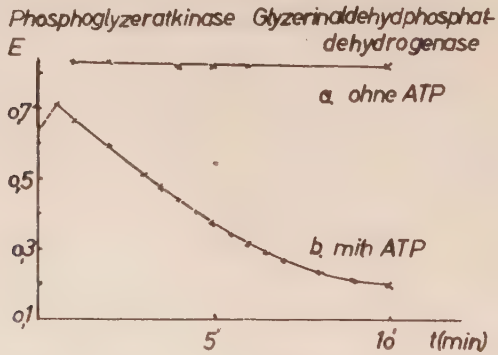

Abb. 7. Nachweis von Phosphoglyzerat-Kinase und Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase.
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mµ
a. Leerversuch ohne ATP; ohne 3-Phosphoglyzerat (identische Kurven)
b. Enzymansatz

Versuch 8

Nachweis von Enolase.

Reaktion: 2-Phosphoglyzerat - H_2O $\xrightarrow{Enolase}$ 2-Phosphoenol-pyruvat

2-Phosphoenol-pyruvat + ADP $\xrightarrow[(zugesetzt)]{PK}$ Pyruvat + ATP

Pyruvat + DPN.H + H^+ $\xrightarrow[(zugesetzt)]{MDH}$ Laktat + DPN^+

Versuchsansatz:

200 µl Trispuffer 0,1 m pH 7,2 + $MgSO_4$ 10^{-2}m

10 µl ADP 10^{-2}m

40 µl 2-Phosphoglyzerat 5 x 10^{-2}m

5 µl DPN.H 10^{-2}m

5 µl Pyruvat-Kinase (Boehringer)

5 µl Milchsäure-Dehydrogenase (Boehringer)

10 µl Amöbenhomogenat, 1'x 9000 g, etwa 8 Amöben entsprechend

Den Reaktionsablauf zeigt Abb. 8.

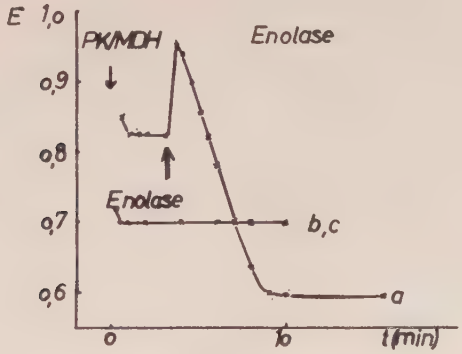

Abb. 8. Nachweis von Enolase.
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mµ
a. Vollversuch PK/MDH: Zugabe von Milchsäure-Dehydrogenase/Pyruvat-Kinase
Enolase: Zugabe von Amöbenhomogenat
b, c. Leerversuche ohne 2-Phosphoglyzerat; ohne ADP (identische Kurven)

Versuch 9

Nachweis von Pyruvat-Kinase (PK).

Reaktion:

Phosphoenol-pyruvat + ADP $\xrightarrow{PK}$ Pyruvat + ATP

Pyruvat + DPN.H + H^+ $\xrightarrow[\text{(zugesetzt)}]{MDH}$ Milchsäure + DPN^+

Versuchsansatz:

240 µl Veronalpuffer 0,1 m pH 7,2

15 µl Phosphoenol-pyruvat 10^{-2} m + KCl 1,3 m + $MgSO_4$ 0,4 m

5 µl DPN.H 1,2 x 10^{-2} m

2 µl Milchsäure-Dehydrogenase (Boehringer)

20 µl ADP 0,1 m

20 µl Amöbenhomogenat, 1' x 9000 g zentrifugiert, entsprechend etwa 10 Amöben.

Den Reaktionsablauf zeigt Abb. 9.

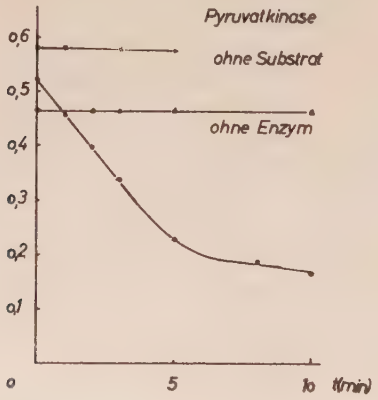

Abb. 9 Nachweis von Pyruvat-Kinase
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mµ
- . - Enzymansatz
- - Leerversuch ohne Homogenat
- x - Leerversuch ohne Phosphoenol-pyruvat.

Versuch 10

Nachweis von Isozitrat-Dehydrogenase (ID).

Reaktion: Isozitrat + TPN^+ $\xrightarrow{ID}$ α-Ketoglutarat + TPN.H + H^+

Versuchsansatz:

265 µl Trispuffer 0,1 m pH 7,2
10 µl Isozitrat 10^{-2} m
2 µl $MnSO_4$ 1,5 x 10^{-2}m
10 µl TPN^+ 2,5 x 10^{-2}m
20 µl Amöbenhomogenat von ca. 10 Amöben.

Das Reaktionsgemisch wird kurz zentrifugiert (1' x 9000 g).
Den Reaktionsablauf im Überstand zeigt Abb. 10.

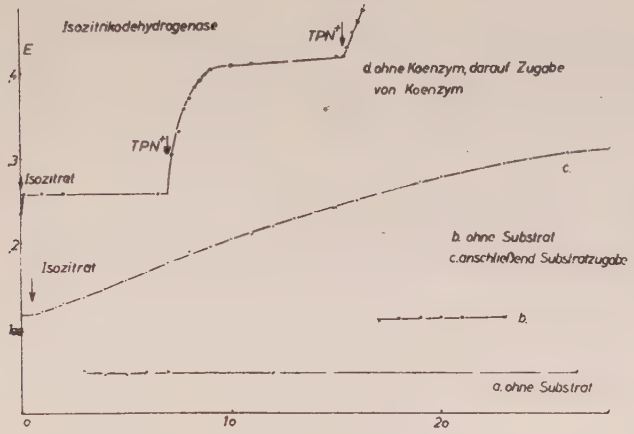

Abb. 10. Nachweis von Isozitrat-Dehydrogenase
Abszisse: Inkubationszeit in min.
Ordinate: Extinktion bei 366 mμ
a. ohne Isozitrat, zentrifugiert 0' nach Enzymzugabe
b. ohne Isozitrat, zentrifugiert 15' nach Enzymzugabe
c. Fortsetzung von b, Zugabe von Isozitrat
d. Vorinkubation von Amöbenenzym + Isozitrat, dann Zugabe von TPN^+.

Versuch 11

pH-Aktivitätskurve der Isozitrat-Dehydrogenase.

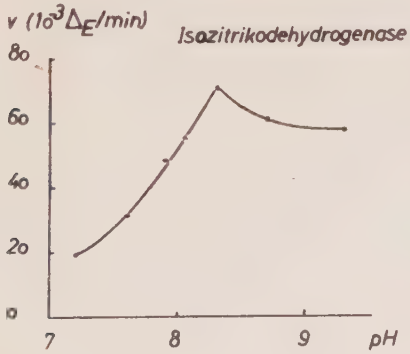

Abb. 11. pH-Aktivitätskurve der Isozitrat-Dehydrogenase.
Abszisse: pH des Reaktionsgemisches.
Ordinate: Aktivität in 10^{+3} Δ_E/min bei 366 mμ.

Versuch 12

Nachweis von "malic enzyme" und Fumarase.

Reaktion: Fumarat + H_2O $\xrightarrow{\text{Fumarase}}$ Malat

Malat + TPN^+ $\xrightarrow{\text{malic enzyme}}$ Pyruvat + CO_2 + TPN.H + H^+

Zum Nachweis der Fumarase werden beide Reaktionen gekoppelt. Das "malic enzyme" dient hierbei als Hilfsenzym.

Versuchsansatz:

265	µl	Trispuffer 0,1 m pH 7,2
10	µl	TPN^+ 2,5 x 10^{-2} m
10	µl	Malat 1,5 x 10^{-2}m bzw. Fumarat 3,2 x 10^{-1}m
2	µl	$MnSO_4$ 1,5 x 10^{-2} m
20	µl	Amöbenhomogenat von ca. 10 Amöben

Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert (1' x 9000 g). Den Verlauf der Reaktion im Überstand zeigt Abb. 12.

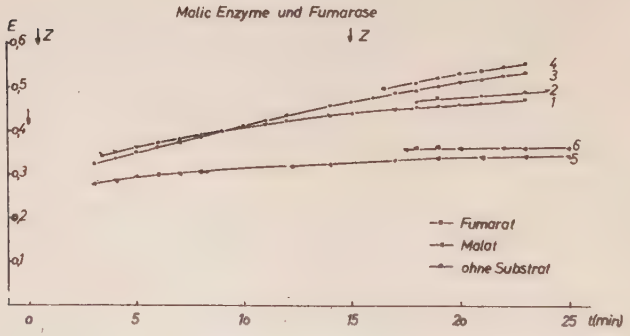

Abb. 12 Nachweis von Fumarase und "malic enzyme".
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mu
1, 2: Malat als Substrat
3, 4: Fumarat als Substrat
5, 6: Leerversuche ohne Substrat
Das Enzymsubstratgemisch wurde entweder sofort zentrifugiert (Kurve 1, 3, 5) oder nach 15' (Kurve 2, 4, 6), um zu zeigen, daß der Bodensatz keine Enzymaktivität enthält.

Versuch 13

Nachweis von Äpfelsäure-Dehydrogenase (ÄDH).

Reaktion:

$$\text{Oxalazetat} + \text{DPN.H} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{ÄDH}} \text{Malat} + \text{DPN}^+$$

Versuchsansatz:

275 µl Veronalpuffer 0,1 m pH 7,2

5 µl DPN.H 10^{-2} m

10 µl Oxalazetat 7 x 10^{-3}m

10 µl Amöbenhomogenat, zentrifugiert 1' x 9000 g, etwa 2-10 Amöben entsprechend.

Den Reaktionsverlauf zeigt Abb. 13.

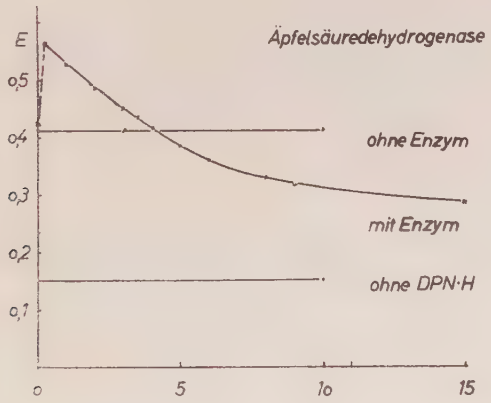

Abb. 13. Nachweis von Äpfelsäure-Dehydrogenase
Abszisse: Inkubationszeit in min.
Ordinate: Extinktion bei 366 mµ

Versuch 14

pH-Aktivitätskurve der Äpfelsäure-Dehydrogenase.

Als Puffer diente ein Veronal-Na-Azetat-Puffer pH 5,4 bis 8,85 0,1 m.

Das Ergebnis zeigt Abb. 14 (nächste Seite).

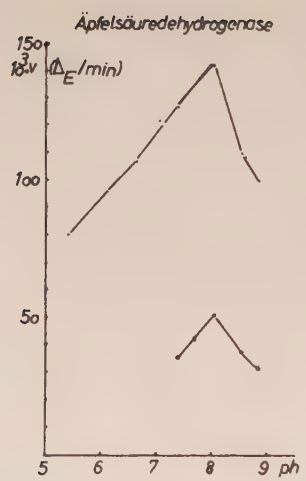

Abb. 14. pH-Aktivitätskurve der Äpfelsäure-Dehydrogenase.
Abszisse: pH-Wert des Reaktionsgemisches
Ordinate: Aktivität in $10^{+3}\Delta_E$/min
Die untere Kurve zeigt das Ergebnis einer Kontrolle mit geringerer Aktivität.

Versuch 15

Enzymsubstratsättigung der Äpfelsäure-Dehydrogenase. Die geometrische Auswertung der Abb. 16 ergibt für Oxalazetat die Michaelis-Konstante $K_M = 10^{-4}$m. Die Beziehung zwischen Substratkonzentration und Aktivität zeigt Abb. 15, (nächste Seite).

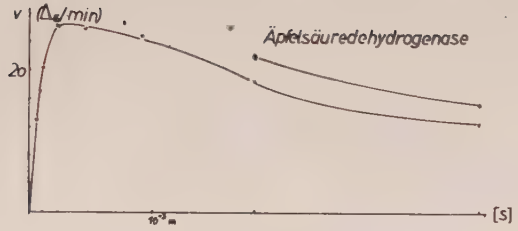

Abb. 15. Enzymsubstratsättigungskurve der Äpfelsäure-Dehydrogenase.
Abszisse: Molare Substratkonzentration
Ordinate: Aktivität in $10^{+3}\Delta_E/\text{min}$

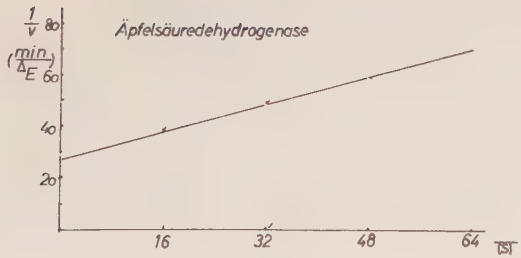

Abb. 16. Schema nach Lineweaver-Burk der Äpfelsäure-Dehydrogenase.
Abszisse: Kehrwerte der relativen Substratkonzentrationen (relative Konzentration 1 = 0,003 85 m)
Ordinate: Kehrwerte der Aktivität.

Versuch 16

Enzymkonzentration und Äpfelsäure-Dehydrogenase-Aktivität.

Ein Amöbenhomogenat unbekannter Konzentration wurde mehrfach verdünnt und die Aktivität der Verdünnungen bestimmt. Abb. 17 zeigt die lineare Beziehung zwischen Enzymmenge und Enzymaktivität im untersuchten Bereich.

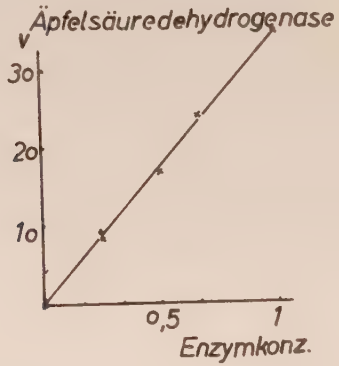

Abb. 17. Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Äpfelsäure-Dehydrogenase-Aktivität.
Abszisse: relative Enzymkonzentrationen
Ordinate: Aktivität in $10^3 \Delta_E$/min bei 366 mμ.

Versuch 17

Nachweis von Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH).

Reaktion:

Glukose-6-phosphat + TPN^+ $\xrightarrow{\text{G-6-PDH}}$ 6-Phosphoglukonat + TPN. H + H^+

Versuchsansatz:

200 µl Trispuffer 0,1 m pH 7,2
50 µl Glukose-6-phosphat 6,1 x 10^{-2}m
10 µl TPN^+ 2,5 x 10^{-2}m
20 µl frisches Amöbenhomogenat, 2' x 9000 g zentrifugiert, etwa 20 Amöben entsprechend.

Den Reaktionsablauf zeigt Abb. 18 (nächste Seite).

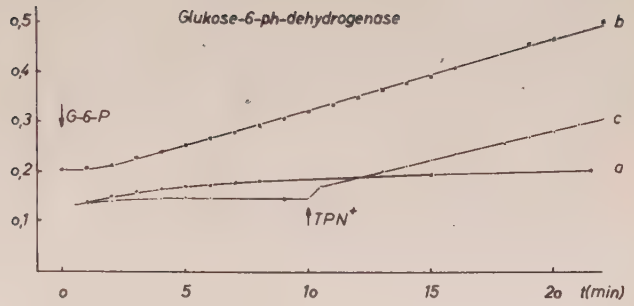

Abb. 18. Nachweis von Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase.
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Extinktion bei 366 mμ
a. Vorinkubation ohne Glukose-6-phosphat
b. Fortsetzung von a mit Glukose-6-phosphat
c. Vorinkubation ohne TPN^+, dann Zugabe von TPN^+.

Versuch 18

pH-Aktivitätskurve der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Das Ergebnis zeigt Abb. 19.

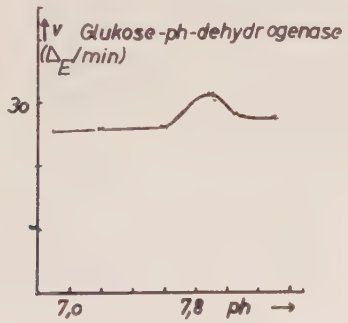

Abb. 19.
pH-Aktivitätskurve der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase.
Abszisse: pH
Ordinate: Aktivität.

Versuch 19

Enzymsubstratsättigung der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die höchste Substratkonzentration betrug $1,22 \times 10^{-2}$m = relative Konzentration 1. Die Beziehung zwischen Substratkonzentration und Enzymaktivität zeigt Abb. 20.

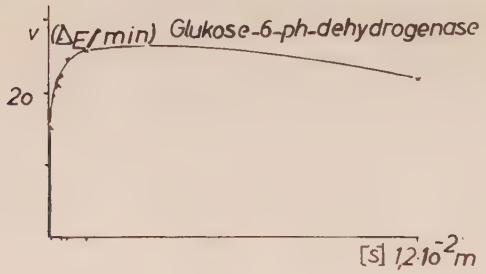

Abb. 20. Enzymsubstratsättigungskurve der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase.
Abszisse: Konzentration von Glukose-6-phosphat
Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit in $10^3\Delta_E$/min bei 366 mμ.

Die Auswertung nach dem Schema von Lineweaver-Burk (Abb. 21) ergibt für die Michaelis-Konstante

$$K_M = \frac{1,22 \times 10^{-2}\text{m}}{111\ (\text{relat. Konz.})} = 1,1 \times 10^{-4}\text{m Glukose-6-phosphat.}$$

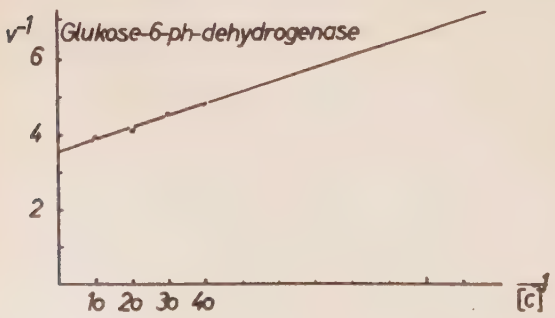

Abb. 21. Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Schema nach Lineweaver-Burk.
Abszisse: Kehrwerte der relativen Substratkonzentrationen
Ordinate: Kehrwerte der Reaktionsgeschwindigkeit.

Versuch 20

Bestimmung von Adenosin-5'-triphosphat.

Prinzip: Die verwendete Bestimmungsmethode für Adenosintriphosphat (ATP) benutzt den optischen Test nach O. WARBURG (56) gemäß folgender Gleichungen:

$$\text{ATP} + \text{Phosphoglyzerat} \xrightarrow{\text{PGK}} \text{ADP} + \text{1,3-Diphosphoglyzerat}$$

$$\text{1,3-Diphosphoglyzerat} + \text{DPN.H} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GAPDH}} \text{Glyzerinaldehyd-phosphat} + \text{DPN}^+ + \text{Phosphat.}$$

Durch Abfangen des Glyzerinaldehyd-phosphates mit Zystein verläuft die Reaktion quantitativ in der angegebenen Richtung. Pro MOL ATP wird ein MOL DPN.H oxydiert. Die auf BÜCHER (55), (57) zurückgehende Technik wurde dem Mikromaßstab angepaßt.

Reagenzien: Testkombination der Fa. Boehringer, Mannheim.

Ansatz:

240 µl Reaktionsgemisch (0,10 m Triäthanolaminpuffer pH 7,6 + $MgSO_4$ 4×10^{-3} m + Zystein 3×10^{-3}m + 3-Phosphoglyzerat 6×10^{-3}m)

5 µl DPN.H $1,2 \times 10^{-3}$ m +

20 µl ATP-Lösung (3% Perchlorsäurefiltrat)

Ablesen der Extinktion E_o, bei 366 mµ gegen Wasser in der Vergleichsküvette.

4,8 µl PGK/GAPDH

Ablesen der Extinktion in Abständen von 1 min.

Auswertung: Bei kleinen Mengen ATP kommt die Reaktion in wenigen min zum Stillstand. Die Extinktionsdifferenz zu E_o, ist der eingesetzten ATP-Menge direkt proportional. Bei größeren Mengen ATP kommt die Reaktion nicht zum Stillstand; die Extinktion fällt nach 5-10 min ständig weiter ab. Auf Grund eines Nebenbefundes beim Arbeiten mit radioaktivem ATP^{32} ist zu vermuten, daß das verwendete Enzympräparat als Verunreinigung wechselnde Mengen Myokinase enthielt. Fallen große Mengen ADP an, so wird in einer Nebenreaktion wieder

ATP gebildet. Diese Sekundärreaktion wird derart abgezogen, indem man geometrisch auf den Zeitpunkt 0 min extrapoliert (Abb. 22a).

Berechnung: Die Extinktionsdifferenz Δ_E ist der ATP-Menge im Meßbereich direkt proportional:

$$\Delta_E \times 41,5 = \gamma \text{ ATP/Küvette}$$

Eichkurve s. Abb. 22b.

Spezifität und Leistungsfähigkeit: Andere Nukleosidtriphosphate geben keine oder nur eine geringe Reaktion, die wahrscheinlich durch Spuren von ATP bedingt ist (58). Die beschriebene Mikroadaptation des Verfahrens ermöglicht Bestimmungen in Mengen ab 1 γ ATP. Die untere Grenze der Methode läßt sich jedoch noch auf 0,1 γ ATP senken durch Verringerung des Meßvolumens und Messung bei 340 mu.
Beispiel für die enzymatische Mikrobestimmung von ATP mit Hilfe des optischen Tests. Eichkurve.

Die untersuchte Probe enthielt 24,6 γ ATP-Hennig (60% Reinheit). Den Reaktionsablauf und die geometrische Extrapolation zur Bestimmung des Extinktionsabfalles Δ_E zeigt Abb. 22a. Eichkurve s. Abb. 22b.

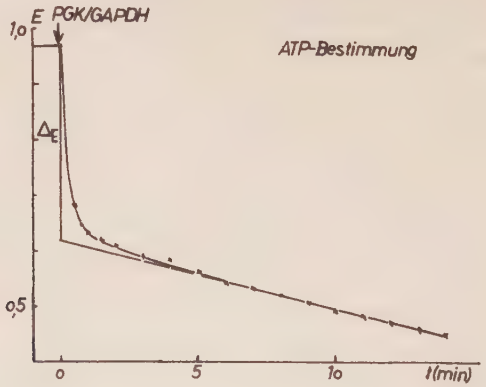

Abb. 22a. Bestimmung des enzymatisch wirksamen Anteils einer ATP-Probe.
Abszisse: Zeit nach Zugabe der Bestimmungsenzyme Phosphoglyzerat-Kinase/Glyzerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase (PGK/GAPDH)
Ordinate: Extinktion bei 366 mμ

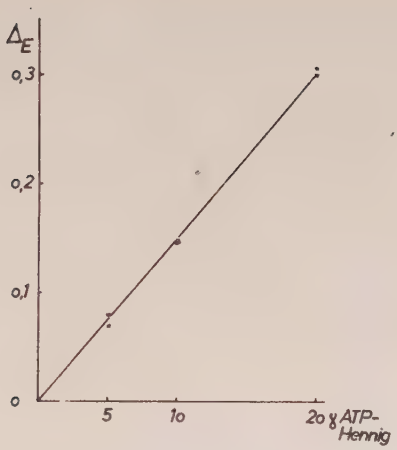

Abb. 22b. Eichkurve zur ATP-Bestimmung.

Versuch 21

Abbau von Adenosin-triphosphat.

Ansatz:

10 µl Na-Azetatpuffer 0,2 m pH 4,0 bis 5,4

10 µl Amöbenhomogenat

10 µl ATP $1,2 \times 10^{-2}$ m

Inkubationszeiten 0 - 30 min. Temperatur: 25°C.

Säurehydrolysewerte: Wasser an Stelle von Homogenat.

Unterbrechung der Reaktion durch

30 µl $HClO_4$ (6%) eiskalt.

Nach Zentrifugieren Bestimmung des verbliebenen ATP mit dem optischen Test.

Ergebnis eines Abbauversuchs bei pH 4,8 s. Abb. 23 (nächste Seite).

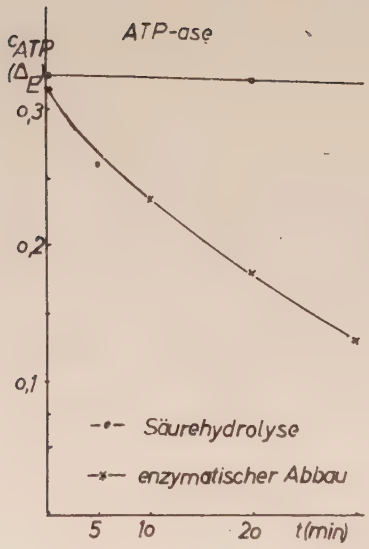

Abb. 23. Abbau von ATP.
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: ATP-Konzentration im Perchlorsäure-extrakt, wobei Δ_E x 41,5 = γ ATP pro Ansatz ist.

Versuch 22

Abspaltung von Orthophosphat aus ATP.

Ansatz: 10 µl Azetatpuffer 0,2 m pH 4,5
10 µl Amöbenhomogenat
10 µl ATP $1,2 \times 10^{-2}$m

Inkubationszeiten: 5-25 min. Temperatur: 25°C

Leerwerte: Säurehydrolyse und Phosphatabstaltung aus dem Amöben-homogenat. Unterbrechung mit 30 µl Trichloressigsäure. Bestimmung von Orthophosphat im TCE-Filtrat. Das Ergebnis zeigt Abb. 24.

Versuch 23

pH-Abhängigkeit der ATP-ase.

Ansatz wie in dem vorangehenden Versuch, Na-azetatpuffer von pH 4,0 bis 5,1. Inkubationszeit: 5 min. Das Ergebnis zeigt Abb. 25 (nächste Seite).

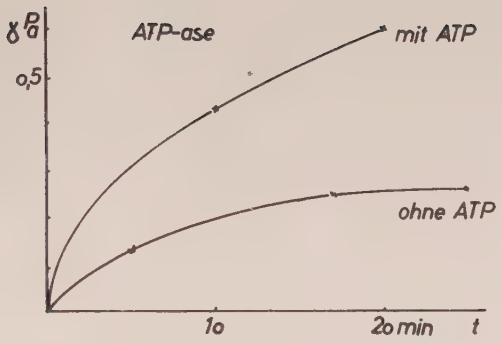

Abb. 24. Zunahme von Orthophosphat infolge enzymatischer ATP-Spaltung.
Abszisse: Inkubationszeit
Ordinate: Freigesetztes Orthophosphat.
In der Serie mit ATP, ohne Amöbenenzym konnte keine Zunahme von anorganischem Phosphat gemessen werden.

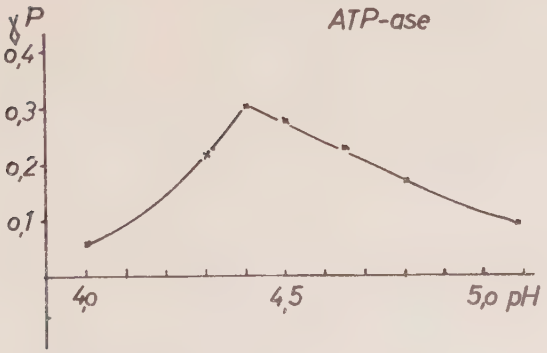

Abb. 25. pH-Aktivitätskurve der ATP-ase.
Abszisse: pH
Ordinate: Aktivität = γ enzymatisch abgespaltenes Orthophosphat/Ansatz x 5 min.

Versuch 24

Beziehung zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit.

Ansatz wie Versuch 22. Inkubationszeit: 5 min.

Für die Eigenspaltung des Enzympräparates und den Orthophosphatgehalt der Substratlösung werden Leerwerte bestimmt und bei der Berechnung berücksichtigt. Konzentration der Stammlösung = $9,5 \times 10^{-3}$m ATP im Versuchsansatz (relative Konzentration 1). Die relativen Konzentrationen bezeichnen den Verdünnungsfaktor, bezogen auf diese Stammlösung.

Die Auswertung nach Lineweaver-Burk (Abb. 26) ergibt als Michaelis-Konstante $K_M = 1,9 \times 10^{-3}$ m ATP.

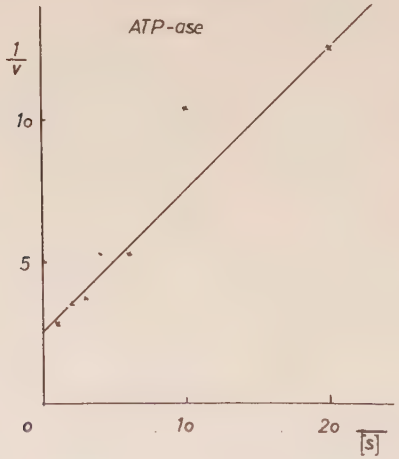

Abb. 26. Schema nach Lineweaver-Burk.
Abszisse: Kehrwerte der relativen ATP-Konzentrationen.
Ordinate: Kehrwerte der Reaktionsgeschwindigkeit.

Versuch 25

Einfluß der Dialyse auf die ATP-ase-Aktivität; Beeinflussung der Aktivität durch Magnesium-ionen.

Das Enzym wird 21 h gegen destilliertes Eiswasser in einen Zellophanschlauch dialysiert. Eine Kontrollprobe wird bei gleicher Temperatur aufbewahrt.

Ansatz wie Versuch 21. Der Mg-Salz ist in Puffer gelöst; der enteiweißte Überstand wird mit Kaliumkarbonat neutralisiert und die Perchlorsäure als Kaliumsalz in der Kälte gefällt.

Der Versuch ergibt gleiche Aktivität von dialysiertem und nicht dialysiertem Enzym. Die Wirkung von zugesetzten Magnesium-ionen auf die Aktivität zeigt Abb. 27.

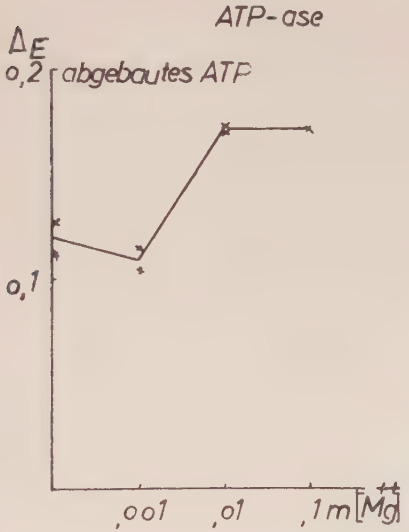

Abb. 27.
ATP-ase-Aktivität bei verschiedenen Mg-Konzentrationen.
Abszisse: Mg-Konzentration.
Ordinate: Aktivität
(ΔE^x 41,5 = γ ATP abgebaut/20 min x Ansatz)

Versuch 26

Aktivität der ATP-ase in Abhängigkeit von der Zeit.

Löslichkeit des Enzyms.

Enzym: Amöbenhomogenat, bei Zimmertemperatur aufgehoben, zu Versuchsbeginn zentrifugiert (2 min bei 13 000 g).

Es werden bestimmt: Aktivität des Bodensatzes
Aktivität des Überstandes
Aktivität des Gesamthomogenates.

Der Bodensatz hatte keine eindeutig nachweisbare Aktivität. Die anderen Ergebnisse sind aus Abb. 28 zu ersehen.

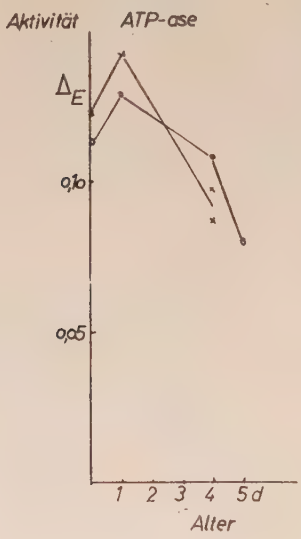

Abb. 28.
Alterungskurve der ATP-ase.
Abszisse: Alter des Enzyms in Tagen
Ordinate: Aktivität
x Überstand
o Gesamthomogenat

Versuch 27a

Papierchromatographie der Adenosinphosphorsäuren I. Beziehung zwischen Wassergehalt des Lösungsmittels und Wanderungsgeschwindigkeit.

Methode: Aufsteigend, eindimensional.

Lösungsmittel: 5,0 g% Trochloressigsäure
20-40 % Wasser
80-60 % Isopropanol

Laufzeit: 6 h Temperatur: 20-22° C

Aufgetragene Mengen: 7-13 γ Gesamt-P pro Bahn je nach Reinheitsgrad der Testsubstanz. Auswertung durch Markieren der Flecke vor der Quarzlampe und Phosphatfärbung mit dem Reagenz nach HANES und ISHERWOOD (37). Das Ergebnis zeigt Abb. 29.

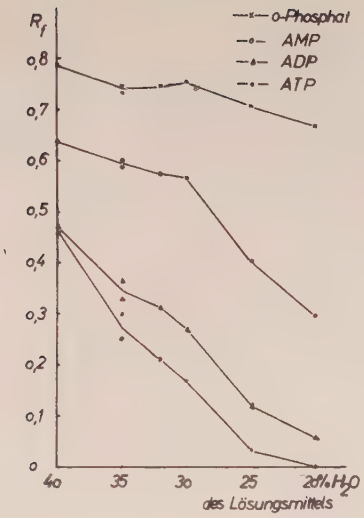

Abb. 29. Einfluß des Wassergehaltes des Lösungsmittels auf die R_f-Werte von ATP, ADP, AMP und Orthophosphat.

Versuch 27b

Papierchromatographie der Adenosinphosphorsäuren II.

Variation des Lösungsmittels durch Ammoniakzusatz.

Lösungsmittel: 4 g% Trochloressigsäure
35 % Wasser
65 % Isoporpanol
o-o,4 ml NH_3 (25%)

Das Ergebnis zeigt Abb. 30 (siehe nächste Seite).

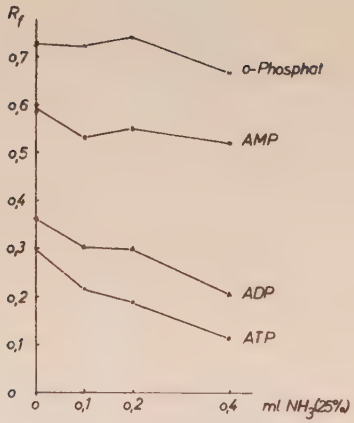

Abb. 30.
Einfluß von Ammoniakzusatz zum Lösungsmittel auf die R_f-Werte von ATP, ADP, AMP und Orthophosphat.

Versuch 28

Papierchromatographie der Adenosin-5'- phosphorsäuren beim enzymatischen Abbau von ATP.

Versuchsansatz wie in Versuch 21 bei pH 4,5. Die zum Enteiweißen benutzte Perchlorsäure wird als Kaliumsalz bei 0°C gefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird folgendermaßen analysiert:

1. Bestimmung des nicht abgebauten ATP im optischen Test. Nach 20 min Inkubationszeit waren 55% ATP abgebaut.
2. Papierchromatographische Analyse der Abbauprodukte. Ein Teil des Überstandes wird bei 10°C aufgetragen, mit kaltem Föhn getrocknet. Methode: Aufsteigend. Papier: Schleicher u. Schüll 2043 b, nach HEALD (36) gewaschen. Temperatur: 10°C. Laufzeit: 18 h. Lösungsmittel 4 g TCE/ 35 ml H_2O/ 65 ml Isopropanol/ 0,2 ml NH_3 (25%). Photometrische Registrierung der Absorption bei 260 mμ im Streifenzusatzgerät zum Zeiss-Spektral-

photometer. Das Ergebnis zeigt Abb. 31. Die Kurven wurden planimetrisch ausgewertet. S. Tabelle 4, S. 22 . Aus dem hier nicht reproduzierten Phosphatbild wird gleichzeitig die Zunahme von Orthophosphat ersichtlich.

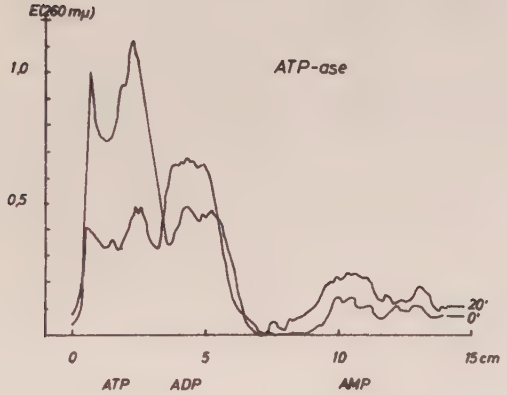

Abb. 31. Photoelektrische Auswertung des Papierchromatogrammes von Versuch 28.
Abszisse: Abstand vom Startpunkt (0) in cm. Die Zacken der einzelnen Substanzen sind bezeichnet.
Ordinate: Extinktion bei 260 mμ

Versuche über die Genauigkeit von Mikropipetten.

Von den in der Literatur beschriebenen Mikropipetten haben sich Konstriktionspipetten aus Glas (28) am besten bewährt. Wir fertigen uns die Pipetten selbst an und haben sehr gute Erfahrungen damit gemacht. Es fiel jedoch auf, daß die Streuung (mittlerer Fehler der Einzelmessung) mit kleiner werdendem Pipettenvolumen zunimmt. Wir führten daher eine systematische Untersuchung über die Genauigkeit

der Konstriktionspipetten durch. Im Verlauf dieser Versuche wurde ein neuer Pipettentyp, eine Polyäthylen-Kapillarpipette, für Volumina von 0,4 - 10 µl entwickelt. Die Herstellung solcher Pipetten ist sehr einfach, und sie erwiesen sich als genauer als Konstriktionspipetten gleicher Größe. Einzelheiten über die Herstellung und Handhabung der Polyäthylenpipetten sind bereits publiziert (29); zum Vergleich wurden die bei der Eichung gewonnenen Werte aber mit in die im folgenden beschriebenen Versuche einbezogen.

Eichung von Mikropipetten: Wir eichen unsere Mikropipetten gravimetrisch mit Wasser oder kolorimetrisch mit p-Nitrophenol.

Eichung mit p-Nitrophenol: 278,22 mg = 2 mMol umkristallisiertes p-Nitrophenol (Merck) wird unter leichtem Erwärmen auf 200 ml 0,1-n NaOH gelöst. 1 ml (= 10 u Mol p-Nitrophenol) auf 250 ml mit 1-n NaOH aufgefüllt ergibt bei 1 cm Schichtdicke bei 400 mµ im Spektralphotometer E = 0,730 und im Photometer Eppendorf mit Filter 405 mµ E = 0,760. Die Verdünnung für die Pipetteneichung soll zwischen 1 : 500 und 1 : 250 liegen, um im Photometer immer mit annähernd gleicher Genauigkeit ablesen zu können. Wir gehen so vor, daß wir das Pipettenvolumen aus einer vorgelegten Menge 1-n NaOH mit der mit NaOH vorgespülten Pipette herauspipettieren und durch p-Nitrophenollösung ersetzen. Wir haben für alle unsere Konstriktionspipetten den mittleren Fehler des Mittelwertes $F_m = \sqrt{\frac{\sum(f^2)}{n(n-1)}}$, angegeben in Prozent des Mittelwertes, bestimmt. In Abb. 32 ist F_m% aus jeweils 5 Messungen gegen die Mittelwerte der Pipettenvolumina aufgetragen. Die Punkte geben die Ergebnisse der gravimetrischen, die Kreise die Ergebnisse der kolorimetrischen Eichung wieder.

Folgendes läßt sich aus der Abbildung 32 entnehmen:

1) F_m nimmt erwartungsgemäß für Konstriktionspipetten mit abnehmendem Volumen zu, wobei der Anstieg von etwa 25 µl an steil verläuft.

2) Die gravimetrisch ermittelten Werte liegen bei Verwendung einer

Analysenwaage mit einer Ablesegenauigkeit von 0,1 mg höher als die kolorimetrisch bestimmten. Die Genauigkeit der gravimetrischen Bestimmung ließe sich natürlich mit einer empfindlicheren Waage verbessern.

3) Die Pipetten lassen sich in 5 Gruppen (I - V) mit annähernd gleicher Genauigkeit und Streuung zusammenfassen. Eine besondere Gruppe stellen die Polyäthylenpipetten dar. Die horizontalen Linien in Abb. 32 (ausgezogen gravimetrisch, durchbrochen kolorimetrisch ermittelte Werte) geben den Mittelwert für alle Pipetten der betreffenden Gruppe an. Die Mittelwerte der Gruppen (kolorimetrisch geeicht) sind in Tab. 5 zusammengestellt.

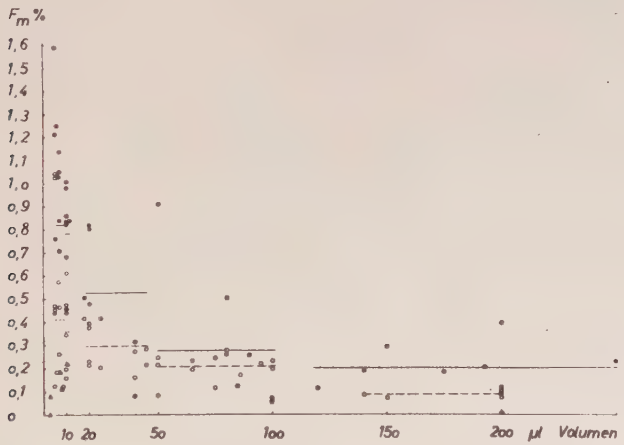

Abb. 32. Ergebnisse der Eichung von Konstriktionspipetten aus Glas.
Abszisse: Volumen in µl
Ordinate: Relativer mittlerer Fehler des Mittelwertes
Punkte: gravimetrische Eichung
Kreise: kolorimetrische Eichung.

Tabelle 5

Streuung und mittlerer Fehler des Mittelwerts von Mikropipetten.

Gruppe	Volumen (µl)	f_m(%)	F_m(%)
I	5 - 9	0,92	0,41
II	5 - 11	0,81	0,36
III	18 - 45	0,63	0,28
IV	50 - 100	0,45	0,20
V	140 - 200	0,18	0,08
Polyäthylen	0,4 - 10	0,43	0,19

Die Polyäthylenpipetten mit Volumina von 0,4 - 10 µl erreichen danach im Durchschnitt Genauigkeit und Streuung von Konstriktionspipetten mit 50 - 100 µl. Der Vorteil der Polyäthylenpipetten liegt ferner darin, daß sie wesentlich einfacher als Konstriktionspipetten auf gewünschtes Volumen eingestellt werden können. Konstriktionspipetten sind dagegen in ihrer Bedienung einfacher. Bei Volumina unter 10 µl wird aber das Verhältnis von Volumen zur inneren Pipettenoberfläche so ungünstig, daß daß die Streuung wegen des anhaftenden Flüssigkeitsfilmes zunimmt. Da Polyäthylen stark hydrophob ist, bleibt kein Flüssigkeitsfilm zurück. Inzwischen wurde von MATTENHEIMER ein sehr einfaches Verfahren zur Herstellung von Konstriktionspipetten aus Polyäthylen entwickelt (62).

Zusammenfassung.

Die von LINDERSTROM-LANG und HOLTER begründete Technik der Mikroanalyse zum Nachweis von Enzymen wurde unter Bevorzugung photometrischer Bestimmungsmethoden weiter ausgebaut.

Für bekannte und bewährte Methoden wurden Mikromodifikationen ausgearbeitet, die die Bestimmung von Enzymaktivitäten in geringen Mengen biologischen Materials (Größenordnung 10^{-3}mg oder 10^{-3}ml) gestatten und die die gleiche Genauigkeit wie Makromethoden haben.

Mit diesen Mikromethoden wurden in Amöben (Amoeba chaos L.) über deren Kohlenhydratstoffwechsel nur sehr wenig bekannt war, folgende Enzyme nachgewiesen: Hexokinase, Phosphohexose-Isomerase, Aldolase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase, Enolase, Pyruvat-Kinase, Isocitrat-Dehydrogenase, Fumarase, Äpfelsäure-Dehydrogenase, "Malic-enzyme", Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 2 ATP spaltende Enzyme. Wenn aus der Enzymsequenz der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus auch einige Enzyme noch nicht nachgewiesen wurden (die entsprechenden Methoden sind noch nicht ausgearbeitet), so kann doch aus den vorliegenden Ergebnissen und aus einigen Mitteilungen in der Literatur geschlossen werden, daß Glukose von Amöben über Glykolyse und Zitronensäurezyklus metabolisiert wird.

Der Nachweis von Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase läßt einen "shunt"-Mechanismus vermuten; doch wurde auf weitere Enzyme noch nicht untersucht. Milchsäure-Dehydrogenase wurde in Amöben nicht gefunden.

Mit dem Nachweis der Enzyme der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus wurde eine empfindliche Lücke in der Kenntnis des Stoffwechsels der in der biochemischen Zytologie häufig verwendeten Amoeba chaos chaos geschlossen. Die ausgearbeiteten Mikromethoden gestatten Enzymanalysen in wenigen Zellen und ermöglichen in zukünftigen Untersuchungen über den Einfluß des Zellkerns auf den Stoffwechsel der Amöbe die Enzyme des Glukosestoffwechsels zu berücksichtigen, was aus Mangel an geeig-

neten Mikromethoden bisher unterbleiben mußte.

In einem besonderen Abschnitt wird die Genauigkeit von Mikropipetten untersucht. Eine neu entwickelte Mikropipette aus Polyäthylen ist im Bereich unter 10 µl genauer als Konstriktionspipetten aus Glas der gleichen Größenordnung.

D. Literaturverzeichnis.

1. C. Chapman-Adresen, D. M. Prescott: Studies on Pinocytosis in the Amoebae Chaos chaos L and Amoeba proteus. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 30, 54 (1956)

2. N. Andresen: Coalescence between Vacuoles during vital Staining with Neutral Red of Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 25, 147 (1945)

3. N. Andresen, H. Holter: Cytoplasmatic Changes during Starvation of the Amoeba Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 25, 107 (1945)

4. H. Holter: A colorimetric Method for Measuring the Volume of Large Amoebae. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 25, 156 (1945)

5. F. E. Lehmann: Der Feinbau der Organoide von Amoeba proteus und seine Beeinflussung durch verschiedene Fixierstoffe. Ergebnisse der Biologie XXI, 89 (1959) Springer-Verlag, Berlin.

6. J. Brachet: Biochemical Cytology. 1957, Academic Press Inc. Publ. New York. (s. auch Nr. 15)

7. H. Holter, S. Løvtrup: Proteolytic Enzymes in Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 27, 27 (1949)

8. H. Mattenheimer, H. Holter: Unveröffentlichte Versuche.

9. K. M. Møller, D. M. Prescott: Observations on the Cytochromes of Amoeba proteus, Chaos chaos L. Experim. Cell Research 9, 375

10. H. Holter u. a.: Succinic Dehydrogenase and Cytochrome Oxydase in Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 27, 408 (1951)

11. H. Mattenheimer, K. M. Møller: Nachweis von Phosphoamidaseaktivität in Amöben. Naturwissensch. 44, 14 (1957)

12. H. Mattenheimer: Polyphosphate und Polyphosphatasen in Amöben. Acta biolog. med. Germ. 1, 405 (1958)

13. H. Mattenheimer, K. M. Møller: Monophosphatase. In Vorbereitung.

14. J. Brachet: La composition enzymatique de fragments nuclées et anuclées d'ámibes. Biochim. Biophy. Acta 14, 449 (1954)

15. J. Brachet: Recherches sur les interactions biochimiques entre le noyau et le cytoplasme chez les organismes unicellulaires. I. Amoeba proteus. Biochim. Biophys. Acta 18, 247 (1955)

16. C. Chapman-Adresen, H. Holter: Studies on the Ingestion of C^{14}-Glukose in the Amoeba Chaos chaos L. Experim. Cell Research 3, 52 (1955)

17. E. Urbani: Sur la teneur en amylase de fragments nuclées et anuclées d'Amoeba proteus. Biochim. Biophys. Acta 9, 108 (1952)

18. H. Holter: Distribution of some Enzymes in the Cytoplasm of Amoeba. Proc. Roy. Soc. B 142, 140 (1954)

19. D. Mazia, D. M. Prescott: Protein Synthesis in the Cell Nucleus. Nature 175, 300 (1955)

20. D. Mazia, D. M. Prescott: The Role of the Nucleus in Protein Synthesis in Amoeba. Biochim. Biphys. Acta 17, 23 (1955)

21. Škreb-Guilcher: L'influence de la ribonucléase sur la teneur en ATP et la consommotion d'oxygéne des amibes vivantes. Biochim. Biophys. Acta 17, 599 (1955)

22. A. I. Cohen: The Effect of Enucleation on the Level of DPN of amoeba. J. Biophys. Biochem. Cytology 2, 15 (1955)

23. D. M. Prescott, D. Mazia: The Permeability of Nucleated and Enucleated Fragments of Amoebae to D_2O. Experim. Cell Res. 6, 117 (1954)

24. D. M. Prescott: Mass and Clone Culturing of Amoebae Proteus and Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 30, 1 (1956)

25. K. Linderstrøm-Lang, H. Holter: In E. Bamann, K. Myrbäck: Methoden der Fermentforschung. 1941, Leipzig, Georg Thieme Verlag. S. 1138 ff.

26. T. W. James: The Role of the Nucleus in the Mainteance of RNA in Amoeba proteus. Biochim. Biophys. Acta 15, 367 (1954)

27. O. H. Lowry: Mikromethods for the Assay of Enzymes, aus P. S. Colowick, N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, 1957, New York. Bd. IV, S. 366 ff.

28. M. Levy: Eine Mikromethode zur Bestimmung von Stickstoff. Z. physiolog. Chemie 240, 33 (1936)

29. H. Mattenheimer, K. Borner: Mikropipetten (0,4 bis 10 µl) aus Polyäthylen. Mikrochim. Acta 6, 916 (1959)

30. Cohn, Carter: The Separation of Adenosine Polyphosphates by Ion Exchange and Paper Chromatography. J. Amer. Chem. Soc. 72, 4273 (1950)

31. L. V. Eggleston, R. Hems: Separation of Adenosine Phosphates by Paper Chromatography and the Equilibrium Constant of Myokinase System. Biochem. J. 52, 156 (1952)

32. H. A. Krebs, R. Hems: Some Reactions of Adenosine and Inosin Phosphates in Animal Tissues. Biochim. Biophys. Acta 12, 172 (1953)

33. Kunz, Schmid: Über Beziehungen zwischen Kohlehydratstoffwechsel und Adenylsäuresystem in der Ehrlich-Aszitestumorzelle. Z. f. Naturforschung 12b, 743 (1957)

34. E. Thilo, H. Grunze: Papierchromatographie der kondensierten Phosphate. Sitzungsbericht Dr. Akad. Wiss. Berlin Naturwiss-math. Kl. 1953, Nr. 5

35. J. P. Ebel: Recherches sur les poly- et métaphosphates. Mise au point d'une méthode de separation par chromatographie sur papier. Bull. Soc. Chim. France 20, 991 (1953)

36. P. J. Heald: Analysis of Radioactive Phosphates in Extracts of Cerebral Tissues. Biochem. J. 63, 235 (1956)

37. Hanes, Isherwood: Separation of the Phosphoric Esters on the Filter Paper Chromatography. Nature 164, 1107 (1949)

38. Sacks: Adenosine Pentaphosphate from Commercial ATP. Biochim. Biophys. Acta 16, 436 (1955)

39. H. Holter, B. Lowy: Acid Phosphatase in Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg 31, 101 (1959) Ser. chim.

40. S. Løvtrup, A. Pigon: Diffusion and Active Transport of Water in the Amoeba Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 28, 1 (1951)

41. H. Holter, J. M. Marshall jr.: Studies on Pinocytosis in Amoeba Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg 29, 8 (1954)

42. C. Chapman-Andresen: Pinocytosis of Inorganic Salts by Amoeba proteus. Compt-rend. Lab. Carlsberg 31, 77 (1959)

43. C. E. Lumsden: Volume Measurement of Live Amoebae in a Compression Chamber. Compt-rend. Lab. Carlsberg 28 (1953) 358

44. N. Andresen: Cytoplasmatic Components in the Amoeba Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg 24, 140 (1941)

45. N. Andresen: Cytological Investigations on the Giant Amoeba Chaos chaos L. Compt-rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim. 29, 435 (1956)

46. H. Holter, W. L. Doyle: Über die Lokalisation der Amylase in Amöben. Compt-rend. Lab. Carlsberg 22, 217 (1938)

47. O. H. Lowry, J. A. Lopez: The Determination of Inorganic Phosphate in the Presence of Labile Phosphate Esters. J. Biol. Chem. 162, 421 (1946)

48. Th. Bücher u. a.: Diphosphofruktose-aldolase, Phosphoglyzerinaldehyd-dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase und Pyruvat-kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. Z. Naturforschung 8b, 555 (1953)

49. O. Warburg, W. Christian: Gärungsfermente im Blutserum von Tumorratten. Biochem. Z. 314, 399 (1941)

50. A. L. Grafflin, S. Ochoa: Partial Purification of Isocitric dehydrogenase and Oxalosuccinic Carboxylase. Biochim. Biophys. Acta 4, 205 (1950)

51. S. Ochoa: Biosynthesis of Dicarboxylic Acids by Carbon Dioxyde Fixation. J. Biol. Chem. 174, 979 (1948)

52. O. Lindberg, L. Ernster: Determination of Organic Phosphate Compounds by Phosphate Analysis. In D. Glick: Methods in Biochemical Analysis III, 1 (1957) Academic Press Inc. Publ. New York

53. V. Massey: The Crystallisation of Fumarase. Biochem. J. 51, 490 (1952)

54. D. E. Green: The Malic Dehydrogenase of Animal Tissues. J. Biol. Chem. 161, 559 (1945)

55. Th. Bücher: Ein neues Phosphat übertragendes Ferment. Biochim. Biophys. Acta 1, 292 (1947)

56. O. Warburg: Wasserstoffübertragende Fermente. Editio Cantor. Aulendorf/Württemberg 1948

57. Bücher, Schuart: Unveröffentlichte Versuche

58. B. Holloway: Determination of ATP by means of Phosphoglyceric Acid Kinase. Arch. Biochem. Biophys. 52, 33 (1954)

59. A. Kornberg: Reversible Enzymic Synthesis of Diphosphopyridine Nucleotide and Inorganic Pyrophosphate. J. Biol. Chem. 182, 779 (1950)

60. B. L. Strehler, J. R. Totter: Determination of ATP and related compounds: Firefly luminescence and other methods. In D. Glick: Methods of Biochemical Analysis. I, 341 (1957)

61. H. Holter: Technique of the Cartesian Diver. Micro Respirometer. Compt-rend. Lab. Carlsberg 24, 333 (1943)

62. H. Mattenheimer: Polyethylene Constriction Pipettes. J. Lab. Clin. Med.: Im Druck. Und in: Mikromethoden für das klinisch chemische und biochemische Laboratorium. Degruyter-Verlag Berlin, 1961, S. 9.

63. A. G. Datta u. a.: Prurification and Properties of 2, 5-Diketogluconic Acid Decarboxylase. Can. J. Biochem. and Physiol. 36, 327 (1958)

64. J. De Ley, M. Doudoroff: The Metabolism of D-Galaktose in Pseudomonas Saccharophila. J. Biol. Chem. 227, 745 (1957)

65. U. Schmitz, H. Mattenheimer: Unveröffentlichte Versuche

66. H. Mattenheimer: Eine Mikromethode zur Bestimmung von Proteinen. Z. physiol. Chem. 316, 202 (1959)

67. C. Chapman-Andresen: Some Observations on Pinocytosis in Leucocytes. Exper. Cell Res. 12, 397 (1957)

68. G. O. Gey u. a.: Activities and Responses of Living Cells and their Components. Ann. New York Acad. Sci. 58, 1039 (1953)

69. A. Kornberg u. a.: Metaphosphate Synthesis by an Enzyme from Escherichia Coli. Biochim. Biophys. Acta 20, 215 (1956)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. med. H. MATTENHEIMER im Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt. Ich möchte hiermit Herrn Priv. Doz. Dr. H. MATTENHEIMER meinen ganz persönlichen Dank für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Fragen abstatten.

Mein Dank gilt fernerhin Herrn Professor Dr. Dr. E. SCHÜTTE und seinen Mitarbeitern für die freundliche Hilfe und Beratung in der täglichen Arbeit.

Lebenslauf

Klaus Burghard Reinhold Borner, geboren am 31. 1. 1936 in Berlin. Eltern: Dr. med. Heinz Borner und Ursula Borner, geb. Greppert.

1955 Abschluß der Reifeprüfung auf der Arndt-Schule in Berlin-Dahlem. Vorklinisches Studium an der Freien Universität Berlin von 1955 - 1957.

Absolvierung der ärztlichen Vorprüfung August 1957, Freie Universität Berlin. Klinische Studien in Innsbruch, Göttingen und Berlin (Freie Universität).

Ablegung der ärztlichen Prüfung vor der Kommission bei der Freien Universität Berlin vom 10. 8. 1960 - 28. 2. 1961.

Photodruck der Photo Copie GmbH.